



Etude du transfert, de l'impact et de la dégradation de l'antibiotique sulfaméthoxazole dans les sols en contexte tropical et tempéré

Manuella Virginia Salgueiro Gondim

► To cite this version:

Manuella Virginia Salgueiro Gondim. Etude du transfert, de l'impact et de la dégradation de l'antibiotique sulfaméthoxazole dans les sols en contexte tropical et tempéré. Sciences de la Terre. Université de Grenoble; Universidade federal de Pernambuco (Récife, Brésil), 2014. Français. NNT : 2014GRENU052 . tel-01240428

HAL Id: tel-01240428

<https://theses.hal.science/tel-01240428>

Submitted on 9 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
GRENOBLE
ALPES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre
l'Université Grenoble Alpes et l'Université Fédérale
de Pernambuco, Recife, Br.**

Spécialité : **Océan, Atmosphère, Hydrologie**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 - 7 août 2006

Présentée par

MANUELLA VIRGINIA SALGUEIRO GONDIM

Thèse dirigée par « **Jean M.F. MARTINS** »

codirigée par « **Antonio C.D. ANTONINO** »

préparée au sein du **Laboratoire d'étude des Transferts en
Hydrologie et Environnement de l'UG** et du **Departamento
d'Energia Nuclear de l'UFPE**,

dans **les Écoles Doctorales Terre-Univers-Environnement
et Programme d'études supérieures en génie civil**

Etude du transfert, de l'impact et de la transformation de l'antibiotique sulfametoxazole (SMX) dans les sols en contexte tropical et tempéré

Thèse soutenue publiquement le « 19 décembre 2014 »,
devant le jury composé de :

Dr Marcus Metri CORREA

Prof. UFRPE Recife, Rapporteur

Dr Laurent LASSABATERE

CR, LEHNA, Lyon, F, Rapporteur

Dr Mario Takayuki KATO

Prof. UFPE Recife, Président

Dr Claude HAMMECKER

CR1 IRD, ECOSOLS Montpellier, Examineur

Dr Antonio C.D. ANTONINO

Prof. UFPE Recife), Co-Directeur de thèse

Dr Jean M. F. MARTINS

CR1 CNRS, LTHE Grenoble, Directeur de thèse.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL (PPGEC)

ESTUDO DAS TRANSFERÊNCIAS E TRANSFORMAÇÕES
DO ANTIBIÓTICO SULFAMETOXAZOL EM SOLOS NO
CONTEXTO TROPICAL E TEMPERADO

MANUELLA VIRGINIA SALGUEIRO GONDIM

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
OUTUBRO, 2014

RESUME FRANCAIS

Ces travaux de thèse ont été développés sous un régime de cotutelle dans le cadre du projet de recherche international TRANSMETH de CAPES/COFECUB, N° 677/10.

Dans un contexte de surexploitation des milieux naturels (anthropisation accélérée) conduisant à la dégradation de leur qualité hydro-bio-géochimique, les objectifs généraux de la thèse étaient d'évaluer le devenir et l'impact des antibiotiques dans les sols. Plus particulièrement, il s'agissait d'étudier de manière couplée les interactions physico-chimiques, biologiques, l'impact associé aux résistances bactériennes et le transport d'un antibiotique modèle, le Sulfaméthoxazole (SMX) dans deux sols pédologiquement proches (Limoneux) mais contrastés en termes d'origine géographique (Brésil et France) et de contexte climatique (tropical et tempéré). Dans ce contexte, le travail de thèse s'est focalisé plus précisément sur 1) l'étude de la sorption du SMX dans les 2 sols modèles et les mécanismes impliqués, 2) l'analyse de l'impact du SMX sur les populations microbiennes des 2 sols modèles, 3) l'évaluation de l'effet du type de sol (statut biologique) et de la concentration en antibiotique appliquée, sur les cinétiques et mécanismes de dégradation du SMX et 4) l'étude des cinétiques et processus de transfert du SMX en colonnes de sols modèles pour évaluer sa mobilité et le risque de dissémination et de contamination des eaux naturelles. L'ensemble de nos résultats a montré que le SMX est une molécule assez peu réactive avec les constituants des deux sols et présente donc une mobilité importante, diminuée notamment par la présence de matière organique dans le sol Macon et par les oxydes de fer dans le sol Recife. Cet antibiotique est également dégradé de manière importante et rapide selon des mécanismes biotiques et abiotiques, ce qui lui confère une persistance faible, mais contrastée, dans les deux sols étudiés. Malgré cette faible persistance, et comme la plupart des molécules bioactives, cet antibiotique apparaît très biodisponible dans les deux sols expliquant le fort impact sur les micro-organismes de deux sols observé même à faible concentration, en modifiant la structure de leurs communautés bactériennes, et en favorisant l'émergence stable de populations adaptées à sa présence et à sa rapide biodégradation. L'ensemble de ces résultats ouvre donc de nouveaux questionnements notamment sur le risque associé à la dissémination croissante des antibiotiques dans l'environnement faisant clairement ressortir 2 types de risques bien distincts: la contaminations des eaux souterraines par des composés organiques potentiellement toxiques et le développement de résistances bactériennes dans les sols de surface, pouvant potentiellement induire des nuisances sanitaires dramatiques.

RESUMO

A disponibilidade de água doce, em diversas regiões, vem diminuindo em função do crescimento da demanda de recursos hídricos, do crescimento da demanda por alimentos (agricultura e pecuária) e dos efeitos da mudança climática em nível mundial devido ao crescimento da população mundial. As práticas agrícolas inadequadas podem levar à poluição das águas superficiais e subterrâneas com pesticidas, fármacos, poluentes, nutrientes e sedimentos. O aumento da demanda na pecuária é um dos fatores que conduziu a um aumento do uso de antibióticos, como o sulfametoxazol, e apesar da grande quantidade utilizada tanto na medicina humana como na veterinária, e do risco de contaminação dos aquíferos associados a essa molécula, seu destino no solo ainda não está claro e é pobremente documentado. Os objetivos deste trabalho foram estudar as interações físico-químicas e biológicas, o impacto associado à resistência bacteriana e o transporte do sulfametoxazol (SMX) em dois solos distintos, embora com características granulométricas semelhantes. Os solos são de diferentes origens geográficas (Recife, Brasil e Macon, França), usos (urbano e agrícola) e condições climáticas (tropical e temperada). Os ensaios de sorção foram divididos em: cinética, isoterma de sorção e sorção em função do pH, uma vez que o sulfametoxazol é uma molécula ionizável. Os ensaios de biodegradação foram realizados em três concentrações diferentes do sulfametoxazol (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M) para avaliar o efeito das características dos solos e da concentração do SMX sobre a biodegradação da molécula do SMX. Os solos não tratados Macon e Recife têm uma diversidade equivalente, segundo o cálculo do índice de Shannon (H'), e do índice de Simpson. Os ensaios de deslocamento miscível em colunas de solo com o KBr e o sulfametoxazol foram satisfatórios para as vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 mL.min⁻¹. A identificação dos mecanismos envolvidos no processo de transporte e a determinação dos parâmetros hidrodispersivos dos solos, através das curvas de eluição do KBr e do sulfametoxazol, foram realizadas utilizando o modelo CDE (convecção-dispersão). A cinética de sorção foi melhor descrita com o modelo de segunda ordem e as isotermas de sorção foram não lineares. O modelo CDE representou adequadamente os dados experimentais das curvas de eluição do sulfametoxazol. O solo Recife, em relação ao Macon, apresentou o menor risco de contaminação do lençol freático existente nessa região.

Palavras chave: SMX, sorção, transporte, biodegradação, solo.

ABSTRACT

This PhD work was conducted under a co-tutelle regime, in the frame of the TRANSMETH international project funded by CAPES/COFECUB N°677/10.

In a context of natural media over-exploitation (accelerated anthropogenization) leading to the degradation of their hydro-bio-geochemical quality, the main goal of this thesis was to evaluate the fate and impact of antibiotics in soils. A specific coupled approach was developed to study the biogeochemical interactions, the impact associated to bacterial resistance and the mobility of a model antibiotic, Sulfomethoxazole (SMX), in two model soils of similar texture (clay loams) but contrasted in terms of geographical origin (Brazil and France) and of climatic context (tropical and temperate). In this context the study focused more specifically on four aspects: 1) the study of SMX sorption kinetics and mechanisms in the two soils, 2) the analysis of SMX impact on the microbial communities of the two model soils, 3) the effect of the soil type (biological status) and of the applied antibiotic concentration on the degradation kinetics and mechanisms of SMX and 4) the study of the transfer kinetics and mechanisms of SMX in soil columns to evaluate its mobility and the risk of dissemination and contamination of aquifers. Our results showed that SMX is a weakly reactive molecule in soils and presents a significant mobility, limited especially by soil organic matter content in the temperate soil (Macon) and by iron oxides in the tropical soil (Recife). This antibiotic is also strongly and quickly degraded by biotic and abiotic processes, conferring to the molecule a low persistence, which is however contrasted in the two soils. Despite this low persistence, and consistently with most biologically active molecules, this antibiotic appears highly bioavailable in the two soils, thus explaining its strong impact on soil microorganisms, even at low concentration, as it modified significantly the structure of the microbial communities of the two soils, and induced the durable emergence of bacterial populations adapted to its impact and biodegradation. These results open new question especially on the risk associated with the increasing dissemination of antibiotic molecules in the environment, clearly evidencing two specific risks: aquifer contamination by potentially toxic molecules and the development of resistance mechanisms in bacterial populations of surface soils, which can in turn potentially induce heavy sanitary problems.

RESUME ETENDU

Etude du transfert, de l'impact et de la transformation de l'antibiotique sulfaméthoxazol (SMX) dans les sols en contexte tropical et tempéré

par

MANUELLA VIRGINIA SALGUEIRO GONDIM

1. Introduction générale	1
2. Objectifs et démarche	2
3. Matériel et Méthodes	3
3.1 L'antibiotique modèle : le sulfaméthoxazole	
3.2 Les sols modèles	
3.3 Sorption du SMX dans les sols	
3.3.1 Cinétiques de sorption du SMX	
3.3.2 Isothermes de sorption du SMX	
3.3.3 Effet du pH du sol sur la sorption du SMX	
4. Résultats et Discussions	4
4.1 Sorption du SMX dans les sols	5
4.2 Impact du SMX sur les microorganismes des sols	6
4.3 Dégradation du SMX dans les sols	7
4.4 Transfert du SMX en colonnes de sols	8
5. Conclusions et perspectives	9

1/ INTRODUCTION GENERALE

L'alerte donnée par le 4e rapport mondial des Nations Unies sur le développement des ressources en eau (WWDR4) énonce qu' « à mesure que la demande en eau potable augmente dans le monde en lien avec la démographie, la probabilité de fournir de l'eau douce en quantité suffisante pour toutes les populations diminue, en relation notamment avec le changement global ».

Parmi tous les défis mondiaux en lien avec l'eau, la limitation de la ressource en eau, la préservation de sa qualité, les relations entre l'eau et la sécurité alimentaire, ainsi que la nécessité d'améliorer sa gestion sont les plus prégnants dans un contexte d'accès et de contrôle de la ressource en eau. Ces défis vont encore s'intensifier dans le futur, en lien avec l'incertitude croissante et le risque associés à la disponibilité et la qualité des ressources en eau et en sols, à cause aussi de l'augmentation de la demande spécifique de divers usages, de la variabilité climatique et les catastrophes naturelles.

En effet, l'agriculture, la production d'énergie, les usages industriels et la consommation humaine représentent la quasi-totalité de la demande en eau. L'agriculture et l'élevage consomment l'eau de manière intensive. L'agriculture utilise à elle seule 70% de la ressource en eau prélevée. La croissance importante de la demande en eau pour l'élevage est spécifiquement responsable d'une grande partie de l'augmentation de la demande en eau potable. On estime que la demande mondiale en aliments va augmenter de 70% d'ici à 2050.

La croissance démographique, la demande croissante en aliments et le changement climatique vont donc exercer une énorme pression sur les ressources naturelles et en particulier sur l'eau et le sol. L'eau est un élément indispensable pour tous les principaux secteurs socioéconomiques, avec un apport spécifique pour chacun d'eux. L'agriculture, en particulier, requiert de l'eau de bonne qualité pour divers processus de production. L'accès à l'approvisionnement en eau potable et de bonne qualité sanitaire est nécessaire pour le maintien de la santé publique.

En parallèle, le marché mondial d'aliments devient chaque jour plus contrôlé par les changements de régimes alimentaires et les habitudes de consommation vers des produits animaux (FAO, 2006). En 2008, 3.350 millions d'hectares de sol ont été utilisés comme pâturages—plus de deux fois les surfaces utilisées pour les cultures en rotation et permanentes. Le développement galopant de l'agriculture et de l'industrie est

considéré fréquemment comme la principale cause de détérioration de la qualité des eaux de surface et souterraines (WWAP, 2006). Le secteur de l'élevage, en particulier, évolue à un rythme sans précédent en fonction de la demande dans les économies, avec les plus forts taux de croissance dans le monde pour des aliments d'origine animale (Steinfeld et al., 2006). L'élevage contribue ainsi à plus de 40% de la valeur globale de la production agricole et constitue une des parties les plus dynamiques de l'économie agricole, poussée par la croissance démographique, du pouvoir d'achat et de l'urbanisation. En parallèle, l'élevage, tout comme l'agriculture intensive, constitue un consommateur majeur de substances ou éléments polluants pour l'environnement et en particulier pour les eaux et les sols. Ces activités sont notamment très consommatrices de produits de protection sanitaire des animaux, tels que les antibiotiques, molécules bioactives qui ont des effets néfastes sur les sols, et notamment sur les microorganismes et donc indirectement des effets potentiels sur l'homme, via l'induction de résistance de microorganismes pathogènes.

Le sol est en effet un des plus importants réservoirs de biodiversité de notre planète, et en particulier de biodiversité microbienne. On estime qu'un gramme de sol abrite plusieurs milliards de bactéries et champignons, avec plus de 1000 espèces différentes (Curtis & Sloan, 2005). Cette grande diversité varie en termes de richesse taxonomique, d'abondance et de distribution en fonction du type de sol, des conditions climatiques, de la végétation et de l'utilisation des terres. A l'interface des quatre autres grands milieux naturels (lithosphère, hydrosphère, atmosphère et biosphère), le sol occupe une position centrale où se déroulent de nombreux processus, contribuant ainsi à un nombre considérable de services écosystémiques. Parmi les services environnementaux, sociaux et économiques identifiés, le sol joue un rôle dans la régulation et la purification de l'eau, le recyclage des éléments minéraux ou organiques à travers l'altération des roches, la dégradation de la matière organique, le stockage du carbone...

Les communautés microbiennes sont des acteurs majeurs du fonctionnement biologique du sol à travers notamment leur implication dans les transformations liées aux cycles biogéochimiques (C, N, P...). Dans les sols, la diversité de ces communautés est régulièrement modifiée par des perturbations liées aux activités humaines (pratiques agricoles, pollutions, inondations...) et la question des conséquences de ces modifications pour le maintien des fonctionnalités des écosystèmes terrestres est aujourd'hui centrale. En particulier, la question de l'effet des contaminations chimiques des sols est centrale dans le contexte de forte anthropisation de nos milieux de vie décrit

précédemment. Les connaissances sur certains types de polluants tels que les métaux lourds ou les pesticides sont aujourd'hui importantes et permettent de proposer des prédictions relativement fiables de leurs impacts et de leur mobilité. En revanche, développer des connaissances sur le devenir et l'impact des polluants nouveaux, dits émergents, tels que les produits pharmaceutiques est devenu une urgence car il est nécessaire de définir de nouvelles pratiques de traitement ou de confinement des déchets dans lesquels s'accumulent ces produits. Ceci est vital pour un fonctionnement durable des écosystèmes terrestres et permettra de préserver la qualité de la ressource en eau ainsi que la santé humaine, mise en danger par les développements de multi-résistances aux produits pharmaceutiques.

En effet, parmi ces produits pharmaceutiques, on trouve les antibiotiques qui sont utilisés de manière intensive en médecine humaine et vétérinaire, ainsi qu'en aquaculture avec l'objectif de prévenir (prophylaxie) ou traiter (thérapie) des infections microbiennes. Des centaines de substances antibiotiques et antimycotiques différentes sont utilisées dans ces domaines. On dénombre ainsi, par exemple, plus de 250 de ces substances en Allemagne (Kummerer and Henninger, 2003). Les données comparables internationalement sur la consommation d'antibiotiques sont plutôt rares, et les quelques informations disponibles restent hétérogènes (Kummerer, 2009). Wise (2002) estime que la quantité d'antibiotiques utilisée dans le monde est d'environ 100.000 à 200.000 tonnes/an. De tous les antibiotiques utilisés en Europe et en Suisse, 65% ont été utilisés en médecine humaine. Aux USA, on estime plutôt cette quantité d'antimicrobiens consommés à 22.700 tonnes/an, avec une répartition à part égale entre la médecine humaine et animale (Kummerer, 2009). Un rapport plus récent estime que la production de troupeaux nord-américains requiert plus de 11.000 tonnes d'agents antimicrobiens à des fins non-thérapeutiques, principalement pour favoriser la croissance bovine, porcine et aviaire. Les utilisations cliniques sont estimées à environ 10% de l'utilisation totale d'agents antimicrobiens (Union of Concerned Scientists, 2001).

Des pratiques inadaptées en agriculture ou en élevage, ainsi que des systèmes de traitement de ces produits inadaptés ou inexistantes (stations d'épuration) peuvent donc conduire à la pollution de ces eaux par des produits pharmaceutiques, polluants, et autres nutriments. L'Impact inclut aussi la contamination des sources d'eau par des organismes pathogènes potentiellement résistants à ces produits à partir de fumier animal par exemple. Les eaux contaminées peuvent ainsi faciliter la transmission de maladies quand les eaux résiduaires des stations d'épuration sont utilisées pour irriguer

ou fertiliser les plantations. Ces pratiques sont de plus en plus utilisées dans beaucoup de zones péri-urbaines à travers le monde, spécialement en zones arides et semi-arides. Ces zones sont caractérisées par une intense compétition pour l'usage de l'eau entre l'agriculture et l'utilisation urbaine. La combinaison avec les changements d'habitudes alimentaires des populations urbaines représente une vraie menace pour la santé humaine (Drechsel et al., 2010), d'autant que les résistances aux antibiotiques se développent actuellement de manière quasiment irréversible et constituent un des plus importants enjeux de santé publique mondiale.

En effet, ces dernières années, une grande variété de résidus pharmaceutiques a été détectée dans tous les compartiments de l'environnement. L'apparition dans l'environnement de ces composés organiques (dits polluants émergents), a fait naître de fortes préoccupations au sein des populations, notamment car ces contaminants sont bioactifs, c'est à dire qu'ils sont synthétisés pour présenter une action spécifique sur les êtres humains, mais ils induisent également l'apparition de résistances au sein des communautés microbiennes, y compris parmi les microorganismes pathogènes.

L'entrée principale de ces composés actifs dans l'environnement résulte de leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire, suite à leur métabolisation partielle et excrétion après leur administration thérapeutique. Ceci est renforcé par leurs propriétés physico-chimiques qui sont justement choisies pour les rendre persistants afin que leur activité soit maintenue suffisamment longtemps pour assurer leur efficacité *in vivo* (Pedroso et al., 2012). La conséquence directe est leur persistance accrue dans l'environnement telle que constatée aujourd'hui dans tous les compartiments étudiés.

C'est dans ce contexte qu' a été développé ce travail de thèse dont l'originalité principale repose sur l'évaluation simultanée et combinée des interactions physico-chimiques, de la dégradation, de l'impact associé à la résistance bactérienne et du transport d'un antibiotique dans des sols issus de différents usages (urbain et agricole) et condition climatiques (tropical et tempéré). Ce type d'étude n'a encore, à notre connaissance, jamais été réalisé à ce jour.

Ces travaux de thèse ont été développés sous un régime de cotutelle dans le cadre du projet de recherche international CAPES/COFECUB, N° 677/10, sur l'étude des interactions, des mécanismes de biodégradation par des microorganismes spécifiques et du transport de composés organiques en sols urbains. Ce projet s'intitule : « Transfert et transformation de métaux lourds et de HAP en sols anthropisés (TRANSMETH) », avec une convention entre l'Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, *via* les

départements de Energia Nuclear(DEN), de Engenharia Civil (DECIV), de Engenharia Química (DEQ), de Antibióticos (DANTI) et de Química Fundamental (DQF); et l'Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE via les Départements de Agronomia (DEPA) et de Tecnologia Rural (DTR); et l'Université de Grenoble –GU (Grenoble - Institut National Polytechnique et UJF - Université Joseph Fourier) via le Laboratoire des Transferts en Hydrologie et Environnement (LTHE) et le Laboratoire de Géotechnique Interne et Tectonophysique (LGIT) devenu aujourd'hui l'Institut des Sciences de la Terre (ISTerre, Grenoble, France); et l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat via le Laboratoire des Sciences de l'Environnement, devenu aujourd'hui le Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) (Lyon, France).

2/ OBJECTIFS DE LA THESE

Dans un contexte de surexploitation des milieux naturels (anthropisation accélérée) conduisant à la dégradation de leur qualité hydro-bio-géochimique, les objectifs généraux de la thèse sont d'évaluer le devenir et l'impact des antibiotiques dans les sols. Plus particulièrement, il s'agit d'étudier les interactions physico-chimiques, biologiques, l'impact associé aux résistances bactériennes et le transport d'un antibiotique modèle, le Sulfaméthoxazole (SMX) dans deux sols pédologiquement proches (Limoneux) mais contrastés en termes d'origine géographique (Recife, Brésil et Macon, France), de contexte climatique (tropical et tempéré). De nombreux travaux (Kim et al. 2014ⁱ et références citées) ont en effet montré une adaptation progressive des communautés microbiennes à leur contexte pédoclimatique, ce qui suggère que des sols de zones géographiques différentes pourraient présenter des réponses très différentes à des contaminations par des polluants émergents de type antibiotique.

Dans ce contexte, le travail de thèse se focalise plus précisément sur :

- i) L'étude de la sorption du SMX dans les deux sols modèles et la compréhension des mécanismes impliqués et des effets de facteur édaphiques importants tel que le pH;
- ii) L'analyse de l'impact du SMX sur les populations microbiennes des 2 sols modèles en termes quantitatifs (énumérations) et qualitatifs (biodiversité) et sur l'évolution temporelle des bactéries hétérotrophes cultivables totales et résistantes au SMX.
- iii) L'évaluation de l'effet du type de sol (statut biologique) et de la concentration en antibiotique appliquée sur les cinétiques de la dégradation de la molécule de SMX et sur les mécanismes impliqués.

- iv) L'étude des cinétiques et processus de transfert du SMX en colonnes de sols modèles pour évaluer sa mobilité et le risque de dissémination et de contamination des eaux naturelles.

3/ DEMARCHE GENERALE ET APPROCHES SUIVIES

La démarche générale retenue pour le développement de cette thèse est une démarche de laboratoire faisant appel à des approches combinées de dynamique des systèmes, permettant de découpler les processus grâce à l'utilisation de colonnes de sols de caractéristiques et conditions aux limites contrôlées, et de microcosmes (batch) permettant de caractériser finement les processus et mécanismes biologiques et physico-chimiques contrôlant la transformation et la réactivité du SMX dans les deux sols modèles étudiés. Ces approches expérimentales ont été complétées par une approche de modélisation afin de confronter les observations à des modélisations déterministes (convection dispersion et réaction) ou plus empiriques (type GUS) pour une évaluation et prédiction du risque associé à la dissémination et à la persistance de l'antibiotique SMX dans les écosystèmes terrestres.

Ce travail est structuré en 5 parties distinctes qui ont fait ou font actuellement l'objet de la rédaction d'un article scientifique national ou international :

1/ La première partie est une introduction générale présentant le contexte de ce travail et la problématique scientifique globale liée au devenir des antibiotiques dans l'environnement et notamment dans les sols.

2/ La seconde partie présente les objectifs de la thèse et la démarche adoptée.

3/ La troisième partie présente une revue de la littérature sur les antibiotiques, leur réactivité dans les sols, leur dégradabilité et leur transfert, donnant les bases nécessaires à la compréhension des travaux présentés dans le manuscrit. Après une brève présentation des antibiotiques et des sols, une description approfondie de l'antibiotique modèle ainsi que des sols modèles est fournie. Les principaux processus gouvernant le devenir de polluants organiques dans les sols sont présentés en termes de mécanismes et de modélisation associée.

La dégradation biotique et abiotique de ces molécules bioactives est également présentée, de même que leur modélisation.

4/ La quatrième partie présente le matériel et les méthodes utilisées dans la thèse pour le développement des travaux expérimentaux et théoriques (modélisation).

5/ La cinquième partie, la plus importante, présente les résultats scientifiques obtenus au cours de la thèse. Ces résultats et leur discussion sont organisés en 4 sous-parties centrés sur 1) les interactions de l'antibiotique SMX dans les sols et les principaux facteurs qui les contrôlent, tels que le pH ou la matière organique, 2) l'impact du SMX dans les deux sols modèles et l'isolement de bactéries résistantes et dégradant la molécule antibiotique, 3) la biodégradation du SMX dans les deux sols modèles et également en milieux de culture par une bactérie isolée du sol de Recife présentant de fortes capacités de dégradation et enfin 4) le transport du SMX dans les sols avec un focus sur l'effet de concentration et de l'hydrodynamique par une approche en colonnes de laboratoire.

6/ La sixième partie présente les principales conclusions des travaux menés dans cette thèse ainsi que les perspectives révélées par les avancées effectuées dans ce travail.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 L'antibiotique modèle : le sulfaméthoxazole

Le Sulfamethoxazole (SMX) est un antibiotique de la famille des sulfonamides. Le SMX est un des antibiotiques les plus utilisés dans le monde. On l'utilise communément en santé humaine et animale, raison pour laquelle on l'a détecté dans les sols de diverses régions du globe (Kemper 2007, Mickael et al. 2013). Le SMX est une molécule ionisable (Figure 6) qui présente un comportement variable en fonction du pH du sol dans lequel elle se retrouve. Elle contient en effet deux protons échangeables ($pK_{a1} = 1.6$; $pK_{a2} = 5.7$) et présente une masse molaire de $253,28 \text{ g.mol}^{-1}$ et un Log Kow 0,89 (Kolpin et al., 2002).

3.2 Les sols modèles

Dans cette étude, deux types de sols présentant des propriétés physico-chimiques proches (classification de Köppen) ont été utilisés. Ils diffèrent par leur contexte géographique et climatique. Il s'agit d'un cambisol eutrique prélevé sur un site viticole

au nord de Macon (Bourgogne, France, 46°24'59''N, 4°48'54''E) et d'un sol limoneux prélevé à Recife sur le campus universitaire de l'UFPE (8° 02'31.14'' S, 34°56'36.86''O). Les caractéristiques physico-chimiques des sols sont présentées dans le Tableau 4.

Après l'échantillonnage, une partie des sols a été séchée à l'air, tamisée à 2 mm et stockée à l'air libre et à température ambiante dans l'attente des essais de sorption et de transfert en colonnes. Le reste du sol a été stocké humide et à 4°C à l'abri de la lumière dans l'attente des essais d'impact et de dégradation du SMX.

3.3 Sorption du SMX dans les sols

Les expériences de sorption du SMX sont menées avec 5g de sol sec suspendus dans une solution aqueuse de SMX de concentration variable et sans modification du pH des sols. Les échantillons sont collectés et centrifugés de façon à suivre la disparition (correspondant à de l'adsorption) de l'antibiotique de la solution. Tous les échantillons ont été triplés et des contrôles ont été préparés en parallèle de façon à prendre en considération une possible précipitation du SMX ou une rétention sur la verrerie.

3.3.1 Cinétiques de sorption du SMX

Le temps d'équilibre de la réaction de sorption a été déterminé avec des échantillons de 5 ml prélevés à intervalles de temps réguliers dans une solution initiale de 200 ml de SMX à 10^{-5} M sur une période de 24 h, de façon à suivre la disparition du SMX de la suspension de sol et déterminer le temps d'équilibre de sorption (stabilité de la concentration en solution).

3.3.2 Isothermes de sorption du SMX

Comme pour la cinétique de sorption, les isothermes d'adsorption ont été effectuées en pots fermés (batches) contenant 30 ml de solution aqueuse d'antibiotique à des concentrations croissantes (10^{-7} à 10^{-3} M) dans lesquels sont introduits 5g de sol sec (dans 50 mL d'eau déminéralisée) préalablement stérilisé ou non (autoclavage à 120°C et 1 bar). Après équilibre, la concentration en SMX restant en solution (C_e) est analysée selon la méthode décrite dans la section 3.6.

3.3.3 Effet du pH du sol sur la sorption du SMX

L'effet du pH du sol sur l'adsorption du SMX a été déterminé dans les deux sols en ajustant leur pH à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 12 par ajouts de quantités connues d' HNO_3 ou de NaOH pour un volume final de 50 mL. L'adsorption du SMX a alors été suivie dans ces sols modifiés pour une concentration unique de SMX (10^{-4}M) en suivant le même protocole que pour les isothermes de sorption.

3.4 Impact du SMX dans les sols

Pour évaluer l'impact du SMX dans les sols de Recife et de Macon, nous avons suivi 3 types de bioindicateurs : 1/ le ratio de bactéries hétérotrophes résistantes au SMX (B^{SMX}) et totales (B^{Tot}), 2/ l'indice de diversité bactérienne des sols évalué par empreintes génétiques (DGGE) et 3/ les gènes *sul* (1, 2 et 3) connus pour être impliqués dans la résistance bactérienne au SMX (en parallèle à d'autres mécanismes). Pour le premier bioindicateur, nous avons également cherché à identifier les bactéries hétérotrophes cultivables B^{SMX} et B^{Tot} qui dominent la communauté bactérienne des deux sols en présence de SMX. L'objectif était d'évaluer la pertinence de l'utilisation de ces bactéries comme bioindicateurs spécifiques de l'impact de cet antibiotique et également pour évaluer leurs capacités de biodégradation du SMX pour mieux comprendre l'implication des bactéries résistantes dominantes dans le fonctionnement biologique des sols contaminés aux antibiotiques.

3.4.1 Suivi des bactéries hétérotrophes cultivables dans les sols contaminés au SMX

Pour le suivi de ce bioindicateur, des échantillons de 5g de chaque sol non incubé (T_0) et incubé 30, 60 ou 90 jours avec 0,1 mM de SMX sont mis en suspension dans 50 mL d'une solution de NaCl à 0,9% stérile. La suspension ainsi obtenue aux différents temps d'incubation est broyée (Waring blender) pendant 2 x 30 sec. Après 2 minutes de sédimentation, une aliquote de suspension de sol homogène est prélevée et diluée en série d'un facteur 10. 100 μL de chaque dilution sont étalés sur un milieu gélosé YG constitué d'extraits de levures à 1g/L, de K_2HPO_4 à 0,3 g/L, de KH_2PO_4 à 0,2 g/L, de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,2 g/L et de glucose à 1g/L supplémenté ou non de 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de SMX (bactéries résistantes). Les unités formant colonies (UFC) observées après une

semaine d'incubation à 30°C et à l'obscurité sont dénombrées visuellement, ce qui permet de quantifier les bactéries présentes dans le sol.

L'effet du SMX sur les sols a été déterminé par un test de Student ou t-test ($P < 0,05$) effectué sur les résultats de l'évolution du ratio du nombre de bactéries totales et résistantes dans les deux sols.

3.4.2 Isolement et identification des bactéries hétérotrophes cultivables dominantes dans les sols contaminés au SMX.

a) Isolement des bactéries hétérotrophes cultivables

Pour isoler les bactéries ainsi cultivées, les colonies sont individuellement prélevées sur les boîtes de Pétri et placées dans 2 mL de milieu YG liquide. Après agitation à 225 rpm et à 30°C pendant 24h, un étalement par stries d'épuisement est réalisé sur milieu gélosé YG supplémenté ou non de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SMX. Cette étape est réalisée 3 fois afin de s'assurer de la pureté des souches bactériennes isolées.

b) Identification des bactéries résistantes au SMX par séquençage de l'ADNr 16S

Pour limiter le nombre de bactéries à identifier, nous avons d'abord caractérisé les bactéries redondantes dans notre banque de clones, à l'aide de la technique ARDRA (coupure de l'ADN par une enzyme de restriction permettant d'obtenir des profils de restriction spécifiques de chaque bactérie). Cette analyse permet ainsi d'identifier, avant leur séquençage, les séquences d'ADNr 16S redondantes.

Environ 1 μg d'ADNr 16S amplifié sont digérés par 10 unités d'enzyme HaeIII (Invitrogen) pendant 3 heures à 37°C. Les profils de restriction sont obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose 2% pendant 2 heures à 50 V. La taille des fragments de restriction est appréciée à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). L'analyse statistique des profils « ARDRA » est effectuée avec le logiciel XLSTAT. Les similitudes entre les profils de restriction sont analysées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Ces similitudes sont représentées graphiquement sous forme d'un dendrogramme. L'algorithme de clusterisation utilisé pour construire le dendrogramme est celui de la méthode UPGMA.

Pour ne pas séquencer des fragments d'ADN redondants, les séquences présentant un profil ARDRA identique à 80% sont regroupées en cluster. Un représentant de chaque cluster et toutes les séquences uniques ont été séquencées par la société Genoscreen (Lille, F).

L'ADN génomique de chacune des souches bactériennes résistantes au SMX isolées précédemment a été extrait suivant la méthode décrite par Loncle et al., 1993. Il s'agit d'une extraction par lyse chimique (lysozyme + SDS) suivi d'un traitement au phenol/chloroforme.

L'amplification par PCR est effectuée avec le couple d'amorces 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) et 1492R (TAC GGM TAC CTT GTT ACG ACT T). Il permet d'amplifier la quasi-totalité de l'ADNr 16S, soit des fragments d'environ 1600 paires de bases (pb).

Le milieu réactionnel (50 µL) est composé de: 26,5 µL d'eau; 10 µL de tampon PCR Green GoTaq® Flexi (Promega) concentré 5X; 4 µL de MgCl₂ à 25mM; 4 µL de dNTP à 2,5 mM; 1 µL de chaque amorce à 10µM; 1,25 µL de BSA à 10 mg.mL⁻¹ et 0,25 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase à 5U.µL⁻¹. Ce milieu réactionnel, additionné de 2 µL d'ADN génomique, est placé dans un thermocycleur (C1000, Biorad) et subit le programme suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 94°C suivie de 29 cycles d'amplification composés chacun d'une dénaturation de 1 min à 94°C, d'une hybridation de 1 min à 55°C et d'une élongation de 2 min à 72°C. Le programme s'achève par une élongation finale de 10 min à 72°C. La taille des amplifias obtenus est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La quantité d'ADN est estimée par fluorométrie (QuBit, Invitrogen).

c) Analyse bio-informatique des séquences des gènes codant l'ADNr 16S des souches résistantes au SMX

Les séquences obtenues sont comparées par BLASTN aux séquences de gènes d'ARNr 16S de la base de données GenBank. Les séquences des 3 organismes les plus proches sont sélectionnées, ainsi que quelques séquences de référence de chaque grand phylum bactérien. L'algorithme UCHIME présent dans le package de logiciels MOTHUR v1.31.2 (Schloss, 2009) a été utilisé pour la recherche de séquences chimériques.

L'ensemble des séquences ont été alignées avec MUSCLE et un arbre phylogénétique a été construit par Neighbor Joining disponible sur la plateforme SeaView.

3.4.3 Suivi de la diversité bactérienne dans les deux sols contaminés au SMX

La biodiversité bactérienne des deux sols a été estimée par une approche d'empreintes génétiques obtenues par DGGE (Muyzer, G. 1999) et déterminées à différents temps après la contamination des sols au SMX.

a) Extraction des acides nucléiques des sols

L'ADN métagénomique des différents échantillons de sols étudiés a été extrait à l'aide du kit FastDNATM SPIN for Soil (MP Biomedicals) suivant les indications du fabricant. La quantité d'ADN de chaque échantillon a été appréciée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% par comparaison avec une gamme d'ADN de thymus de veau (Biorad) et par fluorométrie (QuBit, Invitrogen).

b) Caractérisation des empreintes génétiques des sols par DGGE

L'amplification de l'ADN par PCR précédant l'analyse DGGE est effectuée avec le couple d'amorces 515F-GC (GTG CCA GCM GCC GCG GTA A) et 806R (GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT) (Caporaso et al., 2012). Ceci permet d'amplifier la région hypervariable V4 de l'ADNr 16S, soit un fragment d'environ 250 pb. Un clamp GC de 40 pb (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) a été ajouté à l'extrémité 5' de l'amorce 515F afin d'éviter une dissociation totale des fragments d'ADN lors de la DGGE. Afin de comparer plusieurs gels DGGE entre eux, un marqueur de taille est préparé en mélangeant les régions V4 de 6 souches bactériennes de références : *Acinetobacter* sp. XXI-6; *Cellulomonas* sp. VI-6; *Pseudomonas* sp. I-4; *Pseudomonas aureofaciens*; *Escherichia coli* K12 et *Streptomyces* sp. VIII-6. Ce marqueur de taille est déposé dans chaque gel DGGE. Le milieu réactionnel (25µL) est composé de : 13.25 µL d'eau ; 5 µL de tampon PCR Green GoTaq® Flexi (Promega) concentré 5X; 2 µL de MgCl₂ à 25mM; 2 µL de dNTP à 2,5 mM; 0,5 µL de chaque amorce à 10µM; 0,625 µL de BSA à 10 mg.mL⁻¹ et 0,125 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase à 5U.µL⁻¹. Ce milieu réactionnel, additionné

d'un microlitre d'extrait brut d'ADN métagénomique de chaque sol à $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, est placé dans un thermocycleur (Biorad) et subit le programme suivant : une dénaturation initiale de 3 min à 94°C suivie de 29 cycles d'amplification composés chacun d'une dénaturation de 45 sec à 94°C , d'une hybridation de 1 min à 50°C et d'une élongation de 1 min et 30 sec à 72°C . Le programme s'achève par une élongation finale de 10 min à 72°C . La taille des amplifias obtenus est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La quantité d'ADN est estimée comme précédemment, par comparaison avec une gamme d'ADN de thymus de veau.

L'analyse DGGE est effectuée avec un système DCode (Bio-Rad). Des quantités égales de produits PCR (~ 300 ng) sont déposées sur un gel de polyacrylamide 6% (m/v). Les gels de polyacrylamide contiennent un gradient de substances dénaturantes allant de 40% en haut du gel à 60% en bas du gel (une solution 100% dénaturante contient 40% de formamide (v/v) et 7M d'urée). La séparation des produits PCR s'effectue pendant 16h à 60V dans un bain de TAE 1X (40mM Tris, 20 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA) maintenu à 60°C . Les gels sont colorés avec du SYBR Gold (Invitrogen) 1/10000 (v/v) pendant 30 min à l'obscurité, déposés sur une plaque UV afin de visualiser les fragments d'ADN, et photographiés à l'aide d'un système GelDoc XR (Bio-Rad).

Chaque bande observée est considérée comme une unité taxonomique opérationnelle (OTU). L'analyse des profils de bandes (communauté bactérienne) a été effectuée avec le logiciel Quantity One (BioRad). Le bruit de fond des gels a été soustrait par l'algorithme « rollingball » avec un rayon de 50 pixels. Après normalisation des gels, seules les bandes avec un pic d'intensité supérieur à 2% de l'intensité du pic maximum ont été utilisées. L'intensité relative de chaque pic (P_i) correspond à sa surface relative dans chaque profil ($P_i = n_i / N$, où n_i est l'aire sous le pic i , et N est la somme des aires de tous les pics d'un même profil). L'intensité relative de chaque bande a été utilisée pour calculer les indices de diversité de Shannon-Weaver ($H' = - \sum P_i \ln P_i$) et de Simpson ($D = 1 - [\sum_i n_i(n_i - 1)] / [N(N - 1)]$). La richesse spécifique (S) correspondant au nombre total de bande (OTU) par profil DGGE, ainsi que l'indice de Pielou ($J' = H' / \ln S$), représentant l'équitabilité du nombre d'espèces bactériennes dans chaque échantillon, ont également été calculés.

Les données étant distribuée de façon non-uniforme, la comparaison des indices de diversité est effectuée à l'aide d'un test non paramétrique (test U de Mann-Whitney).

Les similitudes entre les profils de bandes ont été analysées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Ces similitudes sont représentées graphiquement sous forme d'un dendrogramme. L'algorithme de regroupement (Clusterisation) des OTU par similarité utilisé pour construire le dendrogramme est celui de la méthode UPGMA.

Les bandes d'intérêts ont été excisées du gel DGGE, dissoutes dans 20 μ L d'eau ultra-pure pendant une nuit à 4°C, ré-amplifiées avec le même jeu d'amorces et séquencées (Genoscreen, Lille, France). L'analyse bio-informatique est réalisée comme précédemment. Une recherche d'homologie avec les séquences d'ADNr 16S complètes des souches bactériennes isolées et résistantes au SMX de notre banque de clones a également été réalisée.

3.4.4 Suivi des gènes *sul1*, *sul2* et *sul3* indicateurs de résistance au SMX

Cette amplification est réalisée afin de déterminer la présence de gènes plasmidiques (les plus mobiles entre bactéries par transfert horizontal) de résistance au SMX (*sul1*, *sul2* et/ou *sul3*) dans les sols étudiés ainsi que dans les souches bactériennes résistantes isolées. Le milieu réactionnel est identique à celui décrit précédemment. Les amorces utilisées pour détecter les gènes *sul1* et *sul2* sont Sul1F 5'-TCA CCG AGG ACT CCT TCT TC-3', Sul1R 5'- CAG TCC GCC TCA GCA ATA TC-3', Sul2F 5'- CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA-3' et Sul2R 5'- GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT-3', dont la température d'hybridation est de 55°C (Chen et al., 2014). Pour *sul3*, les amorces Sul3F 5'- GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG-3' et Sul3R 5'- CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA-3' sont utilisées à une température d'hybridation de 51°C (Perreten and Boerlin, 2003).

3.5 Dégradation du SMX dans les sols

3.5.1 Dégradation biotique et abiotique du SMX dans les sols

La dégradation du SMX dans les deux sols a été déterminée en batchs en suivant l'évolution temporelle de la concentration en SMX dans la phase liquide de suspensions

de sols. Pour cela, les sols ont été homogénéisés puis tamisés à 2 mm et des aliquotes de sols humides (50g équivalent sec) ont été mélangées avec 200 mL d'une solution de SMX (LKT Laboratories, Inc) à 1, 0,1 et 0,01 mM. En parallèle, le même protocole expérimental est réalisé avec des aliquotes de sols stérilisés par autoclavage et avec des témoins sans sol. Chaque condition expérimentale est dupliquée (Tableau R1). Les différents microcosmes ont été incubés à l'obscurité et à 20°C pendant 30 jours et des prélèvements ont été effectués régulièrement au cours du temps.

Tableau R1 : Conditions expérimentales testées pour l'étude de la dégradation du SMX.

1	Flacons de 250 mL	SMX	Sol stérile Macon	Sol non stérile Macon	Sol stérile Recife	Sol non stérile Recife
2	Témoin SMX	200 mL				
3	Témoin SMX Cu					
4	Sol Macon –SMX a	200 mL		50g		
5	Sol Macon –SMX b	200 mL		50g		
6	Sol Macon stérile SMX	200 mL	50g			
7	Sol Macon SMXCu a			50g		
8	Sol Macon SMXCu b			50g		
9	Sol Macon stérile SMX-Cu		50g			
10	Sol Recife –SMX a	200 mL				50g
11	Sol Recife –SMX b	200 mL				50g
12	Sol Recife stérile SMX	200 mL			50g	
13	Sol Recife –SMXCu a					50g
14	Sol Recife –SMXCu b					50g
15	Sol Recife stérile SMX-Cu				50g	

Ma : Macon, Rec : Recife

3.5.2 Biodégradation du SMX par les bactéries cultivables isolées

Deux bactéries cultivables résistantes au SMX isolées du sol de Recife et dominant les profils DGGE ont été sélectionnées pour tester leur capacité à dégrader le SMX en batchs. Le protocole suivi est celui décrit par Larcher et al, 2011. Ces souches environnementales, ainsi qu'une souche d'*E. coli* DH5 α (contrôle négatif), sont indépendamment pré-inoculées dans 100 mL de milieu de culture minéral contenant 6 mg/L de SMX et 0,5 g/L de glucose. Le milieu minimum utilisé est composé de Na₂EDTA-2H₂O à 0,018 g/L, de FeSO₄-7H₂O à 0,013 g/L, de CaCl₂-2H₂O à 0,013 g/L, de MgSO₄-7H₂O à 0,25 g/L, de Na₂HPO₄ à 7,5 g/L, de KH₂PO₄ à 5 g/L, de NH₄NO₃ à 5 g/L, et d'extrait de levures à 0,6 g/L. Après 24h de croissance, un nombre équivalent de cellules bactériennes de chaque pré-culture est placé dans 350 mL qsp de milieu minimum supplémenté en SMX (6 mg/L soit 24 μ M) et en glucose (0,5 g/L). Chaque culture est dupliquée et des contrôles avec une biomasse stérile (inoculation avec une pré-culture autoclavée) et sans biomasse sont préparés afin de déterminer la quantité de SMX adsorbée sur les cellules bactériennes et la verrerie. Les différents batch sont incubés à l'obscurité, à 30°C et agités à 150 rpm. La croissance bactérienne (DO 600 nm) et la concentration en SMX (HPLC) sont mesurées après 1 et 7 jours d'incubation.

3.5 Transfert du SMX dans les sols

Les procédures de préparation et d'utilisation des colonnes de sols sont celles décrits par Martins et Mermoud (1999) et Martins (2008). Les expériences de transfert consistent à introduire dans une colonne de sol soumise à un écoulement permanent d'eau (ou de solution à fond ionique connu) à saturation, un créneau de solution aqueuse de traceur (ion bromure sous la forme KBr à 1 g L⁻¹) ou de SMX (préparé à 10⁻⁵, 10⁻⁴ ou 10⁻³M) et à suivre et analyser le volume et la concentration des effluents récoltés en sortie de colonne avec un collecteur de fractions. L'analyse des échantillons collectés permet de tracer les courbes d'élution $C=f(t)$ qui sont présentées sous forme adimensionnelle ($C/C_0=f(V/V_0)$) pour faciliter leur comparaison et leur analyse qui permet d'identifier les mécanismes de transfert impliqués (Martins 2008). C est la concentration mesurée en sortie de colonne, C_0 est la concentration en bromure ou SMX injectée à l'entrée de la colonne, V le volume élué et V_0 le volume d'eau contenu dans la colonne (volume de pore). Le bilan de masse (BM) et le facteur de retard (R) permettent de quantifier les

interactions entre la matrice et la solution injectée (Equation 3.15). Les paramètres physico-chimiques tels que la concentration en SMX et le débit ont été modifiés indépendamment pour comprendre leur influence sur le transfert de l'antibiotique dans les sols.

Les courbes d'élution du traceur et du SMX ont été ajustées avec Hydrus 1D résolvant l'équation 3.24 (Simunek et al. 1999) afin de caractériser les propriétés hydrodynamiques des 2 sols ainsi que les paramètres de transfert réactif du SMX.

3.6 Analyses chimiques

Les analyses chimiques effectuées dans cette thèse ont été menées au LTHE selon les procédures décrites ci-après, avec les équipements disponibles dans le plateau ATOMS de l'équipe Transpore. Dans le cas du SMX, certaines analyses ont été effectuées également à l'UFPE à Recife (soit plus de 1500 analyses de SMX au total).

L'ion bromure a été utilisé comme traceur de l'eau dans les essais de transfert en colonnes pour caractériser les propriétés hydrodynamique des sols. Les analyses de bromures contenus dans les effluents de colonne ont été effectuées en chromatographie ionique (Metrohm 732/733 separation center, Metrosep A Supp 16 – 150mm, et Metrosep C2-150mm colonne pour anions et cations). Les solutions de bromure ont été préparées sous la forme KBr à une concentration de 1 g L^{-1} .

Le SMX a été analysé dans les suspensions de sol (essais de dégradation et de sorption), dans des milieux de culture (dégradation et impact) ou dans des lixiviats de sols (transport en colonnes de sols). Dans le cas des suspensions de sols, les suspensions de sols sont centrifugées 10 min à 10000 rpm puis filtrées à travers un filtre PVDF de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ et placées dans une fiole ambrée. Dans les autres cas, les solutions sont directement filtrées à $0,22\text{ }\mu\text{m}$. La quantité de SMX est déterminée avec un système HPLC équipé d'un détecteur UV (Spectra system UV 100, Thermo Separation Products) et d'une colonne C-18 (EC 125/3 NUCLEOSIL 100-5 C18, $5\text{ }\mu\text{m}$). La détection du SMX s'effectue à une longueur d'onde de 260 nm et à une température de 40°C . La phase mobile utilisée est un mélange d'acétonitrile (15%), de méthanol (15%), d'eau milli-Q (70%) et d'acide formique (0,02%) et la vitesse du flux est de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le temps d'analyse pour chaque échantillon est de 10 min et le volume d'injection est de $20\text{ }\mu\text{L}$. La limite de quantification du SMX est de $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1 Sorption du SMX dans les sols

La caractérisation de la rétention du sulfaméthoxazole dans le sol de Recife et le sol de Macon en lien avec la réactivité des constituants des sols, a été menée via des expériences en batch afin d'évaluer les cinétiques et les taux de sorption (isothermes) du SMX dans les sols étudiés. L'effet du pH des sols sur la sorption du SMX a aussi été évalué.

Les cinétiques de sorption (Figure 7) sont assez rapides avec des temps d'équilibre d'environ 2 à 10h dans les deux sols. Les cinétiques de sorption ont pu être modélisées (Figures 8 et 9 et Tableau 4.1) efficacement à l'aide d'un modèle de second ordre décrit par Milfont et al. (2008). Ces résultats nous ont permis d'établir les conditions expérimentales pour la caractérisation des isothermes de sorption du SMX. Ainsi, les essais ont été menés sur une durée de 24h permettant d'atteindre l'équilibre du processus de sorption tout en limitant efficacement la dégradation du SMX.

Les isothermes de sorption du SMX dans les sols de Macon et de Recife, stériles et non stériles, sont présentées dans les Figures 10 et 11. Dans les deux sols (stériles ou non), les isothermes présentent une forme quasi linéaire pouvant être décrite indifféremment à l'aide de modèles linéaires, de Freundlich ou de Langmuir. Les paramètres correspondants sont présentés dans le Tableau 8. Sur la base de ces paramètres, une estimation de la mobilité du SMX peut être effectuée en calculant un facteur de retard selon l'Equation 3.15. Ces estimations seront utilisées dans la partie 4.4 sur le transfert du SMX en colonnes de sols pour comparer les résultats obtenus en conditions statiques et dynamiques.

La molécule de SMX étant particulièrement complexe et présentant notamment plusieurs groupements fonctionnels ionisables, cette molécule peut être dissociée de façon variable en fonction du pH (Figure 6). Il est donc apparu indispensable de caractériser l'effet du pH des sols sur la sorption du SMX, afin d'en améliorer la modélisation, en tenant compte à la fois de la forte variabilité du pH des sols naturels et de l'ionisation de la molécule. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 12, qui montre une forte dépendance du taux de sorption du SMX au pH du sol, comme attendu. En effet, la sorption de la forme neutre du SMX (protonée) est deux fois plus élevée que celle de la forme ionisée (au-delà de pH 5.7, qui est le 2nd pK du SMX).

A pH équivalent la sorption du SMX dans le sol de Macon est deux fois plus élevée que dans le sol de Recife, et bien corrélée à la teneur en matière organique des deux sols. Cet effet est toutefois fortement atténué au-delà de pH 5.7 (SMX ionisé) indiquant des mécanismes de sorption différents. Dans cette gamme de pH, l'adsorption du SMX est identique dans les deux sols, suggérant que la MO n'intervient plus significativement dans la rétention de l'antibiotique et que d'autres constituants des sols (e.g. argile, oxydes métalliques...) sont impliqués dans sa rétention, comme cela déjà pu être montré pour d'autres polluants organiques, comme par exemple le pentachlorophénol (Lee et al. 1990).

4.2 Impact du SMX sur les microorganismes des sols

L'impact du SMX a été suivi par deux méthodes complémentaires : une méthode quantitative classique basée sur l'énumération des populations bactériennes hétérotrophes totales ou résistantes à l'antibiotique SMX et une méthode moléculaire qualitative permettant d'évaluer l'impact global du SMX sur la diversité de la communauté microbienne des sols.

Effet du SMX sur les bactéries hétérotrophe cultivables

Le nombre de bactéries hétérotrophes cultivables totales et résistantes dans les sols a été suivi au cours du temps après une contamination au SMX à 3 concentrations différentes (10^{-5} , 10^{-4} et 10^{-3} M).

Les résultats sont présentés dans les Figures 5.3.1 à 5.3.3. Ces figures montrent que le nombre de bactéries totales cultivables est relativement constant entre les traitements. En revanche, le nombre de bactéries résistantes au SMX augmente dans les 2 sols avec la concentration de SMX apportée. Ces résultats indiquent que même si le SMX a un impact sur certaines populations bactériennes des deux sols, ce qui les fait disparaître, celles-ci sont remplacées rapidement par des bactéries résistantes qui se multiplient, d'où un nombre de bactéries totales cultivables relativement constant. On observe aussi que la concentration de SMX influe fortement sur l'impact observé, puisqu'on peut voir que plus la concentration initiale est forte plus la quantité de bactéries résistantes au SMX augmente par rapport au sol non contaminé. Ceci suggère l'existence d'une

réponse linéaire des microorganismes à la dose d'antibiotique apportée, ce qui pourrait faciliter la prédiction de l'impact de ce type de contaminants dans les sols.

Dans le cas du SMX, le ratio B^{SMX}/B^{Tot} s'avère être un bon indicateur de l'impact du contaminant, permettant ainsi d'envisager l'utilisation de cet indicateur facile à mesure et de moindre coût, dans des études d'impact généralisées sur d'autres sols ou d'autres milieux tels que les eaux naturelles.

Isolement des bactéries cultivables totales et résistantes au SMX

Un dénombrement des bactéries cultivables (UFC) totales et résistantes au SMX a été réalisé pour les deux sols à T0 et après 30 jours d'incubation à l'obscurité et à 20°C en présence de 0,1 mM de SMX. Etant donné que la mise en culture des bactéries dépend des caractéristiques biogéochimiques de chaque sol, nous avons comparé le ratio entre le nombre de bactéries résistantes au SMX et le nombre de bactéries totales de chaque sol (Table 1). Initialement, la proportion de bactéries résistantes est plus importante dans le sol de Macon que dans le sol de Recife ($P=0,002$). Après 1 mois d'incubation en présence de SMX, la proportion de bactéries résistantes à cet antibiotique augmente de façon significative dans le sol de Macon ($P=0,03$) (Table 1). La proportion de bactéries résistantes augmente également dans le sol de Recife, atteignant un niveau comparable à celui du sol de Macon.

Assignation taxonomique et analyse phylogénétique des bactéries cultivables isolées

Les ADNr 16S de 30 souches résistantes au SMX isolées à partir de chaque sol à T0 et à T30 (soit 120 séquences ADNr 16S au total) ont été amplifiés par PCR et digérés par une enzyme de restriction. Les profils ARDRA ainsi obtenus ont été analysés et regroupés en cluster. Chaque cluster regroupe les profils ARDRA identique à 80%. Une séquence d'ADNr 16S représentative de chaque cluster, ainsi que les séquences d'ADNr 16S uniques, ont été séquencées. Une assignation taxonomique a été réalisée par comparaison des séquences obtenues à la base de données GenBank (NCBI) et un arbre phylogénétique a également été construit à l'aide de séquences de référence appartenant aux grands phyla bactériens identifiés (Figure 20). Seules 8 séquences différentes ont été identifiées pour le sol de Macon à T0. Elles appartiennent exclusivement à des bactéries du genre *Bacillus* (*Firmicutes*). Après 30 jours d'incubation en présence de SMX, 24

séquences différentes ont été obtenues à partir de ce même sol. Elles sont affiliées aux genres *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Methylo-bacterium*, *Burkholderia* et *Pseudomonas*, appartenant à 3 phyla bactériens (*Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*). A l'inverse, le sol de Recife abrite une plus grande diversité de bactéries cultivables résistantes au SMX à T0, avec 26 séquences différentes identifiées contre seulement 2 après 1 mois d'incubation en présence de l'antibiotique. Les bactéries isolées à T0 appartiennent au genre *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* et appartiennent aux 3 mêmes phyla que ceux retrouvés dans le sol de Macon. Les bactéries isolées à T30 sont affiliées aux genres *Bacillus* et *Burkholderia*.

Parmi toutes ces bactéries cultivables résistantes au SMX, aucune ne possède un des 3 gènes plasmidiques de résistance au SMX connus (*sul*). En revanche, les gènes *sul1* et *sul2* ont été détectés dans l'ADN métagénomique extrait des sols MA et RE avant et après ajout de SMX, indiquant la présence dans les deux sols d'un potentiel de résistance au SMX, y compris en absence de contamination au SMX.

Effet du SMX sur la structure des communautés bactériennes

Pour évaluer l'effet du SMX sur l'ensemble des communautés bactériennes des sols étudiés, des empreintes moléculaires (DGGE) ont été réalisées à partir de la région hypervariable V4 du gène codant l'ARNr 16S. Ces fragments ont été amplifiés à partir de l'ADN total extrait des échantillons de sols Macon et Recife incubés 1, 15 et 30 jours en présence de 0,1 et 1 mM de SMX et discriminés par DGGE (Figure 21). Deux répliques indépendants par traitement et par temps d'incubation ont été analysés ainsi que deux échantillons témoins, non traités au SMX, pour chaque sol.

L'analyse UPGMA montre une répartition des profils de bandes en 2 clusters majeurs (23% de similarité), correspondant aux deux types de sols, et en 8 clusters mineurs (68 à 93% de similarité), correspondant au temps initial et aux 3 temps d'incubation (Figure 22). Un artefact est cependant observé pour un répliqua de l'échantillon de sol MA traité avec 0,1 mM de SMX après 15 jours. Les profils de bandes de chaque réplique montrent une similarité de 88 à 98% pour le sol Recife et de 82 à 97% pour le sol Macon (hors artefact). Ces résultats montrent ainsi la validité des expériences effectuées et leur reproductibilité, puisque les répliques sont bien regroupées.

Le calcul de l'indice de Shannon (H') et de l'indice de Simpson (D) révèle que les sols Macon et Recife non traités au SMX possèdent une diversité équivalente (Tableau 10). L'ajout de 0,1 mM de SMX affecte négativement et significativement la diversité bactérienne du sol Recife pour les 3 temps d'incubation testés. Par ailleurs, la présence de 1 mM de SMX dans le sol Recife entraîne une diminution significative de la diversité uniquement après 15 jours d'incubation. En ce qui concerne le sol MA, aucune diminution significative de la diversité bactérienne n'a été observée après l'ajout de SMX, et ce quelle que soit la concentration ajoutée et le temps d'incubation testé. Ces résultats indiquent que le sol Recife est plus sensible au SMX que le sol Macon.

On observe également une richesse spécifique en bactéries quasi-identique pour les deux sols avant contamination au SMX (Tableau 10). Celle-ci diminue significativement pour le sol Recife 1, 15 et 30 jours après la contamination au SMX à 0,1 mM, et après 1 et 15 jours avec 1 mM de SMX. Aucune différence concernant les résultats d'équitabilité n'a été observée entre les 2 sols, avant traitement ni pour un même traitement avant et après ajout de SMX.

Un résultat particulièrement intéressant est que certaines bandes s'atténuent ou deviennent prépondérantes dès le premier jour après l'ajout de 0,1 ou 1 mM de SMX (Figure 21), indiquant une réponse très rapide des communautés bactériennes à la présence de l'antibiotique. Ce phénomène semble plus marqué pour le sol Recife où notamment deux bandes deviennent très majoritaires. D'une manière surprenante, on observe qu'une de ces 2 bandes est commune aux deux sols et domine également les profils de bandes du sol Macon (MA) après traitement au SMX. Ces bandes majoritaires d'ADN observées sur les 2 profils de sols après traitement au SMX ont été découpées, purifiées et séquencées. Elles ont été identifiées comme appartenant aux genres *Arthrobacter* et *Burkholderia*. De plus, la séquence représentant la bande n°2, exclusivement présente dans le sol Recife, est identique à 100% avec la région V4 de l'ADNr 16S de 2 souches bactériennes isolées à partir du sol Recife témoin : RE-477 et RE-490. Ces bactéries sont apparentées à 98% à *Burkholderia zhejiangensis* (HE983367), *Burkholderiasp. OP-1* (HM802212) et *Burkholderia sp. SFA1* (AB232333), décrites comme capables de dégrader deux insecticides organophosphorés: le méthyl-parathion (Lu et al., 2012) et le fenitrothion (Kikuchi et al., 2012).

4.3 Dégradation du SMX

Dégradation du SMX dans les sols

La dégradation du SMX a été évaluée dans les deux sols tempérés et tropicaux avec pour objectif de quantifier les processus biotiques et abiotiques de dégradation du SMX (Figures 13 à 16 et Tableau 9). Des échantillons de sols stériles et non stériles des deux sols ont été utilisés pour les expérimentations menées en batch (suspensions de sols). Les conditions utilisées sont résumées dans le tableau R1.

Les résultats présentés dans ces figures montrent que le SMX est dégradé dans les deux sols mais plus rapidement dans le sol Macon en cohérence avec la plus forte quantité de microorganismes résistants aux SMX quantifiés dans ce sol, par rapport au sol Recife.

La dégradation du SMX est sous le contrôle de mécanismes biotiques et abiotiques comme le montrent les résultats obtenus avec les sols stérilisés. Pour les deux sols, la concentration initiale de SMX ajoutée au sol est primordiale dans la cinétique de dégradation observée. Ainsi, à la plus faible concentration de SMX (10^{-5} M) la plus susceptible d'être rencontrée dans l'environnement, l'antibiotique est dégradé en quelques jours, la demi-durée de vie, $T_{1/2}$, variant entre 7 et 30 jours dans les sols de Macon et Recife, respectivement, en accord d'autres travaux, comme par exemple ceux de F. Liu et al. 2010 (<http://www.publish.csiro.au/paper/EN09160.htm>.) qui ont trouvé des valeurs comprises entre 2 et 7 jours.

Biodégradation du SMX par les bactéries isolées.

Les capacités de dégradation des deux bactéries isolées précédemment ont été évaluées par des méthodes batchs identiques menées en milieux de culture minéraux additionnés de SMX à 6 mg L^{-1} ($24 \mu\text{M}$).

En effet, compte tenu de la capacité de leurs plus proches parents à dégrader des molécules structurellement proches du SMX, nous avons voulu tester le potentiel de ces 2 bactéries (et de la bactérie témoin *E. coli DH5 α*) à dégrader le SMX. La concentration minimale inhibitrice en SMX a été préalablement déterminée pour chacune des souches testées. Elle est de 50 mg/L pour *E. coli DH5 α* , 256 mg/L pour *RE-477* et 1064 mg/L pour *RE-490*. Les différentes bactéries sont donc capables de croître en présence de 6

mg/L de SMX. La croissance des isolats *RE-477* et *RE-490* dépasse 1 unité de DO à 600 nm, alors que celle de *E. coli DH5α* est au maximum de 0,7. La DO à 600 nm des témoins contenant une biomasse stérile est restée stable au cours du temps, indiquant que les cellules des pré-cultures ont bien été tuées par autoclavage. La concentration en SMX dans ces témoins stériles et dans le témoin abiotique est également stable au cours des 7 jours d'incubation. La sorption du SMX à la biomasse et à la verrerie est donc négligeable.

Le dosage du SMX après 1 et 7 jours d'incubation montre que les souches *RE-477* et *E. coli DH5α* ne sont pas capables de dégrader cet antibiotique (Figure R2). En effet, la diminution de la concentration en SMX est négligeable au cours du temps. Concernant la souche *RE-490*, il apparaît qu'elle a la capacité de dégrader au moins 6 mg de SMX par litre et par jour (Figure 4). D'autres expériences sont en cours afin d'affiner la cinétique de dégradation du SMX par la souche *RE-490*.

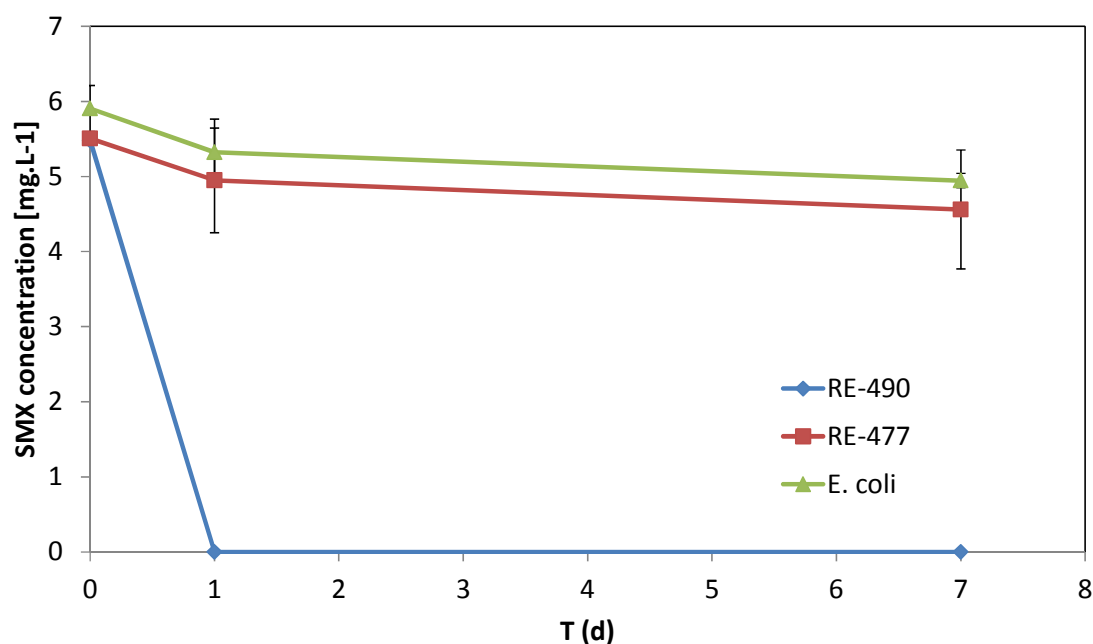


Figure R2 : Biodégradation du SMX par la souche *RE-490*, *RE-477* et *E. coli DH5α*. La concentration initiale en SMX est de 6 mg/L

4.4 Transfert du smx en colonnes de sols

Le transfert du SMX dans les deux sols a été évalué par une approche de dynamique des systèmes basée sur l'utilisation de colonnes de sols remaniés tel que décrit par Martins and Mermoud (1999). Le dispositif utilisé est présenté dans la Figure R3.

Avant d'étudier le transfert du SMX en colonnes nous avons caractérisé l'hydrodynamique des deux sols à l'aide d'un traceur de l'écoulement : l'ion bromure utilisé sous la forme KBr à 1 g/L. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 25 et 26. Le transport du traceur (et du SMX) a aussi été étudié à 3 flux d'eau différents caractérisés par les vitesses de pore moyennes, v , suivantes : 6.3, 10.5 et 16.5 cm/h dans le sol de Recife et 4, 7.7 et 13 cm/h dans le sol de Macon.

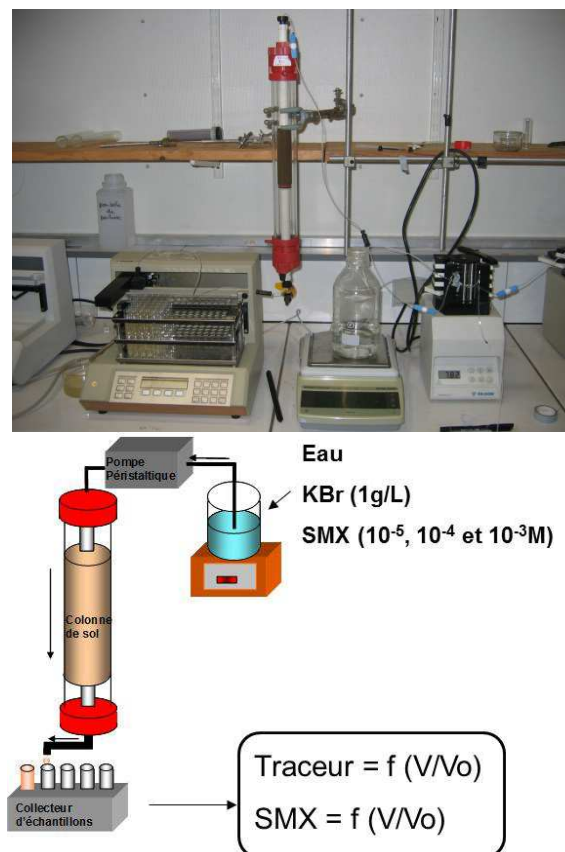


Figure R3 : Le dispositif d'étude du transfert de Sulfamethoxazole en colonnes de sols.

Les valeurs des paramètres hydrodynamiques ajustés sur ces courbes d'élution à l'aide du modèle de convection Dispersion (Eq. 4.2) sont présentées dans le Tableau 12. Le sol de Recife présente une dispersivité de 0.24 cm, supérieure à celle du sol de Macon (0.11 cm), en cohérence avec sa plus forte teneur en argile. Le traceur présente également un facteur de retard inférieur à 1 dans le sol de Recife, indiquant que toute l'eau ne participe pas à l'écoulement, puisque l'ion bromure ne « voit » pas toute l'eau, contrairement au sol de Macon, où le retard est légèrement supérieur à 1.

Le transport du SMX dans les deux sols a été évalué à 3 concentrations différentes pour tenir compte de la non-linéarité de l'isotherme de sorption constatée dans les Figures 10 et 11. Les résultats de transfert sont présentés dans les Figures 27 à 29 dans le sol de Recife et les Figures 30 à 32 pour le sol de Macon. Les paramètres de transfert ajustés sur ces courbes avec le modèle de convection-dispersion sont présentés dans le Tableau 13.

Les résultats montrent une forte influence de la concentration initiale en SMX et de la vitesse de pore sur la mobilité du SMX dans les deux sols. Le sol de Recife apparaît comme le plus réactif en comparaison du sol de Macon, au vu des valeurs de facteurs de retard du SMX déterminées pour les 3 concentrations dans ce sol. Le SMX est donc plus mobile dans le sol de Macon que dans le sol de Recife. Ces résultats sont assez surprenants compte tenu des résultats des isothermes de sorption (S_{\max} de 90 et 110 mg Kg⁻¹, dans les sols de Macon et Recife, respectivement) et des propriétés physicochimiques de ce sol qui contient environ 3 fois moins de MO que le sol de Macon, la MO étant connue pour favoriser la rétention des polluants organiques (Martins et Mermoud 1999, Milfont et al. 2008).

Une explication possible serait l'implication forte des oxydes de fer contenus dans le sol de Recife dans la rétention du SMX, comme cela a déjà été suggéré par Milfont et al. (2008) pour un autre polluant organique, le Paclobutrazol. En effet les oxydes de fer tels que la goethite sont chargés positivement (Gao and Pedersen 2010) aux valeurs de pH des deux sols étudiés alors que le SMX, lui, est déprotoné et donc majoritairement chargé négativement. Ceci favoriserait donc potentiellement des interactions par transfert de charge entre le SX et les surface des oxydes de fer.

Malgré les différences de mobilité du SMX observées entre les deux sols, on peut considérer que cette mobilité est particulièrement élevée puisque les facteurs de retard calculés sont inférieurs à 2. La molécule de SMX est donc transportée quasiment à la vitesse de l'eau, montrant ainsi un risque particulièrement élevé de transfert sur de longues distances et donc de contamination des nappes phréatiques.

Ces résultats sont en accord avec diverses études qui ont montré la forte mobilité du SMX dans différents contextes de sols ((Thiele, 2003; Boxall et al, 2003, Thiele-Bruhn et al., 2004 & Burkhardt et al., 2005).

5/ CONCLUSION

Cette thèse en cotutelle a été menée conjointement dans les laboratoires LTHE de l'Université de Grenoble et DEN de l'UFPE. Ces travaux de recherche pluridisciplinaires avaient pour but de caractériser les principaux processus contrôlant le devenir et l'impact d'un antibiotique modèle, le sulfamethoxazole, dans les sols en contexte tropical et tempéré. Deux sols aux propriétés texturales très proches (sols limoneux) ont été collectés à Recife au Brésil et à Macon en France, pour représenter des contextes tropicaux et tempéré, respectivement.

Les travaux ont consisté d'abord à caractériser le potentiel de sorption (cinétique et isotherme) du SMX dans chacun des deux sols afin d'estimer leur rétention dans ces sol et identifier les principales phases responsables de cette sorption, et les mécanismes correspondants.

Comme attendu, le SMX est peu retenu dans ces deux sols (S_{\max} de 100 à 120ng SMX g^{-1} de sol au pH des deux sols), avec des isothermes de sorption non instantanées (cinétiques de sorption de second ordre) et non linéaires dans les deux sols et bien représentées par les modèles de Freundlich et de Langmuir, présageant de biodisponibilité et mobilité importantes de cet antibiotique dans les deux types de sols.

L'impact du SMX a été évalué en combinant une approche quantitative (énumération de bactéries hétérotrophes cultivables totales et résistantes au SMX) et une approche qualitative (variation de l'indice de diversité bactérienne (Shannon et Simpson) mesuré par des empreintes moléculaires de type DGGE). Après contamination des deux sols aux SMX à des concentrations variant de 10^{-5} à $10^{-3}M$, une diminution rapide du nombre total de bactéries du sol a été observé (- 32 et - 55% dans les sols de Macon et Recife, respectivement) en combinaison avec une augmentation rapide du nombre et de la proportion de bactéries résistantes (+ 34 et + 20%, dans les sols de Macon et Recife, respectivement), qui ont alors représenté jusqu'à 35% des bactéries totales (sol Macon), indiquant un impact important du SMX sur les communautés bactériennes des deux sols. Concernant l'effet du SMX sur la diversité microbienne, nos résultats sur les sols non contaminés ont d'abord montré des structures de communauté microbiennes initiales très différentes entre les deux sols, bien que les indices de biodiversité (Shannon) soient similaires et élevés dans les deux sols, ainsi que les richesses taxonomiques. Nous avons observé un effet significatif du SMX dans les deux sols mais plus important dans le sol de Recife. Pour ce dernier, la structure des communautés microbiennes a fortement évolué au cours du temps (baisse de biodiversité et de

richesse spécifique en bactéries) quelle que soit la concentration en antibiotique utilisée, contrairement à celle du sol de Macon, qui est moins impactée et semble donc plus stable, probablement en lien avec des bactéries plus adaptées et résistantes au SMX. Après contamination au SMX, nous avons observé la disparition rapide de certaines populations sensibles et l'émergence de populations résistantes à l'antibiotique sur les profils DGGE. Les populations bactériennes cultivables totales et résistantes au SMX dominantes ont pu être identifiées par séquençage de l'ADNr16S, ce qui a permis de montrer une forte domination de bactéries du genre *Burkholderia* déjà connues pour dégrader de nombreux polluants organiques tels que les pesticides ou HAP. Des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Arthrobacter* ont également été identifiées parmi les bactéries dominantes après contamination au SMX. Une espèce bactérienne commune aux deux sols et résistante au SMX a pu être identifiée : il s'agit d'une bactérie du genre *Arthrobacter*. De manière très originale, nous avons pu identifier une bactérie cultivable dont la population domine largement (40%) la structure de la communauté bactérienne (DGGE) du sol de Recife. Cette bactérie est apparentée au genre *Burkholderia* et présente des capacités de résistance ($\text{CMI} > 1 \text{ g L}^{-1}$) et de dégradation du SMX ($T_{1/2} \approx 0.5 \text{ j}$) tout à fait remarquables, et laissant présager d'un potentiel très important en termes de bioremédiation de milieux (aquatiques ou terrestres) pollués par ce type produit.

Par ailleurs les gènes de résistance au SMX, *sul1* et *sul2*, ont été détectés dans l'ADN métagénomique extrait des sols de Macon et de Recife avant et après ajout de SMX, indiquant de manière originale l'existence d'un réservoir important de bactéries résistantes à cet antibiotique de synthèse, y compris dans le sol de Recife qui ne semble pas avoir été préalablement en contact avec cette molécule. L'absence de ces gènes chez certaines bactéries résistantes isolées indique, en complément à ces voies spécifiques (*sul*), la mise en œuvre par les bactéries indigènes de ces sols d'autres stratégies de résistance plus globales basées sur des systèmes d'efflux ou de biodégradation.

Les résultats sur la dégradation du SMX dans les deux sols ont montré que cet antibiotique présentait une persistance assez faible dans les deux sols, avec une demi-vie variant suivant la concentration initiale entre 6 et 52 jours pour le sol de Macon et entre 25 et 80 jours pour le sol de Recife. Déjà plus faible pour ce dernier sol, la dégradation du SMX semble en plus inhibée au-delà de 10^{-4} M de SMX, confirmant la plus faible adaptation de ce sol à la présence de cet antibiotique. La dégradation du

SMX est due pour moitié environ à de la dégradation chimique (hydrolyse...), le reste correspondant à de la biodégradation spécifique effectuée par des microorganismes adaptés, et notamment par la bactérie *Burkholderia* précédemment identifiée et caractérisée. Les paramètres de sorption et de dégradation caractérisés dans les deux premières parties du travail ont permis de calculer un indice de risque de contamination des aquifères dans les deux sols, soit 2,87 à 5,6 pour le sol Macon et 5 à 6,85 pour le sol Recife. Dans les deux sols l'indice calculé est supérieur à 2,8, indiquant un risque important de contamination des eaux, notamment dans le sol de Recife, en lien avec la plus forte persistance du SMX dans ce sol. Pour valider ces indices de risques, la mobilité du SMX dans les deux sols a été évaluée par des essais en colonnes qui ont montré une mobilité différente du SMX dans les deux sols et supérieure dans le sol de Macon (bien représentée par une modélisation de type convection-dispersion avec retard), en contradiction avec les résultats de sorption qui suggéraient une plus forte rétention de l'antibiotique dans ce sol. Toutefois, cette mobilité apparaît très élevée dans les deux sols, en accord avec la littérature, indiquant un fort potentiel de transfert dans les deux sols et donc un risque important de contamination des nappes.

L'ensemble de ces résultats montre que le SMX est une molécule assez peu réactive avec les constituants des deux sols et présente donc une mobilité importante, freinée notamment par la présence de matière organique dans le sol Macon et par les oxydes de fer dans le sol Recife dans les sols. Cet antibiotique est également dégradé de manière importante et rapide selon des mécanismes biotiques et abiotiques, ce qui lui confère une persistance faible, mais contrastée, dans les deux sols étudiés, notamment pour les faibles concentrations, susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement. Malgré cette faible persistance, et comme la plupart des molécules bioactives, cet antibiotique apparaît très biodisponible dans les deux sols et présente un impact important sur les microorganismes de deux sols, même à faible concentration, en modifiant la structure de leurs communautés bactériennes, et en favorisant l'émergence stable de populations adaptées à la présence de cet antibiotique et à sa rapide biodégradation.

L'ensemble de ces résultats ouvre donc de nouveaux questionnements notamment sur le risque associé à la dissémination croissante des antibiotiques dans l'environnement faisant clairement ressortir 2 types de risques bien distincts: la contaminations des eaux souterraines par des composés organiques potentiellement toxiques et le développement de résistances bactériennes dans les sols de surface, pouvant potentiellement induire des nuisances sanitaires dramatiques.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL (PPGEC)

MANUELLA VIRGINIA SALGUEIRO GONDIM

ESTUDO DAS TRANSFERÊNCIAS E TRANSFORMAÇÕES DO
ANTIBIÓTICO SULFAMETOXAZOL EM SOLOS NO CONTEXTO
TROPICAL E TEMPERADO

ORIENTADOR BRASILEIRO: **Prof. Dr. Antonio Celso Dantas Antonino**

ORIENTADOR ESTRANGEIRO: **Prof. Jean Martins**

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL

OUTUBRO 2014

Aos meus pais, irmãos, a minha
tia Eliane e meu marido Edevaldo
Alves por todo esforço que
fizeram para a conquista de meus
objetivos. Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e por tudo que sou, pois sei que és poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos (Ef 3.20).

Ao meus orientadores, Professor Antonio Celso Dantas Antonino e Professor Jean Martins, pelo incentivo e apoio dados a mim em todos os momentos.

Ao Professor Alexandre Schuler e a Professora Suzana Montenegro, pela grandiosa ajuda, pelo carinho e paciência dados a mim em todos os momentos deste trabalho.

Ao meu esposo Edevaldo Alves, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela grandiosa ajuda em todas as fases deste trabalho, pelo seu grande amor e dedicação que muito me incentivaram a superar todos os desafios.

Aos meus pais, Manoel Gondim e Jane Gondim, meus irmãos, Paola Gondim e Manoel Gondim, a minha madrinha Eliane Gondim e toda minha família, por todo carinho, apoio, compreensão dados a mim em todos os momentos de minha vida.

Aos alunos do grupo de Física de Solos pela ajuda fator importante nesta caminhada. A Artur, Rafael, Fernanda, Claudio, Meire, Junior, Leidjane (GRH) e Valmir (Deq) grande ajuda, amizade e companheirismo.

Aos demais docentes e todos os funcionários do Departamento de Energia Nuclear –UFPE e LTHE - UJF.

Aos órgãos financiadores de bolsa de estudos, CAPES Cofecub, CNPq e FACEPE.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Antibióticos	18
3.2 Sulfonamidas	20
3.3 Vias de entrada e ocorrência de antibióticos no ambiente	21
3.4 Transferência de solutos no solo	23
3.4.1 Fatores que afetam a dinâmica de solutos e seu tempo de permanência no solo	23
3.4.2 Processos de transporte de solutos no solo	24
3.5 Tempos característicos do transporte de soluto	31
3.6 Potencial de lixiviação do SMX	32
3.7 Sorção do sulfametoxazol	33
3.8 Biodegradação	35
3.8.1 Modelagem da biodegradação	36
3.9 Impacto e indução de resistências	38
3.10 Transporte reativo	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 – Os solos	41
4.2 O Antibiótico	42
4.3 Análise química do SMX	42
4.4 Os ensaios de sorção	43
4.4.1 Cinética de sorção	43
4.4.2 Sorção em função do pH	43
4.4.3 Isoterma de sorção	44

4.4.4 Modelagem da sorção.....	44
4.5 Os Ensaio de biodegradação.....	46
4.5.1 Crescimento microbiano	47
4.7 Isolamento e identificação de uma bactéria degradadora do SMX, burkholdeira sp.	47
4.9 Isolamento das bactérias heterotróficas totais e resistentes ao SMX	48
4.10 Teste de biodegradabilidade SMX	48
4.11 Extração do DNA genômico das estirpes resistentes SMX e amplificação por PCR do gene de rRNA 16S de estirpes resistentes SMX.	49
4.11.1 Análise dos fragmentos de restrição do DNA ribossômico amplificado.....	49
4.11.2 Análise bioinformática das sequências de genes que codificam 16S rRNA de estirpes resistentes a SMX.....	50
4.12 A amplificação por PCR dos genes de resistência ao SMX, sul1, sul2 e sul3	52
4.13 Transporte dos antibióticos no solo.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Sorção do SMX.....	55
5.2 Biodegradação.....	64
5.2.1 Efeito da concentração do SMX sobre a biodegradação	64
5.3 Impacto.....	69
5.3.1 Evolução das populações bacterianas.....	69
5.4 Isolamento e identificação.....	71
5.4.1 Isolamento das bactérias cultiváveis totais e resistentes ao SMX.....	71
5.4.2 Atribuição taxonômica e análise filogenética.....	72
5.4.3 Efeito do SMX sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos.....	74
5.5 Mobilidade do SMX em colunas de solo	79
5.5.1 Caracterização hidrodispersiva com KBr.....	79
5.5.3 Transporte reativo do SMX.....	83
6. CONCLUSÕES.....	93

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Importantes antibióticos na medicina humana e animal (Fonte: Kemper, 2008).....	19
Tabela 2 - Valores de algumas propriedades físico-químicas de sulfonamidas.	21
Tabela 3- Concentrações de sulfonamidas encontradas na natureza.	23
Tabela 4 – Caracterização granulométrica dos solos estudados.	41
Tabela 5 – Caracterização química.....	42
Tabela 6 - Valores das capacidades de sorção em equilíbrio, Se_1 e Se_2 ; das taxas constante de sorção, k_1 , k_2 e k_i ; e dos coeficientes de determinação, r^2 , para os três modelos e ambos os solos.....	57
Tabela 7 - Valores dos coeficientes de distribuição linear (K_f) para os solos Macon e Recife em condições estéreis e não estéreis.	61
Tabela 8 - Parâmetros da modelagem da biodegradação do SMX.....	69
Tabela 9 – Contagem das bactérias cultiváveis totais e resistentes ao SMX nos solos Macon e Recife antes (T0) e após 30 dias de incubação com 10^{-4} M de SMX (T30)....	72
Tabela 10 – Valores do índice de diversidade, riqueza de espécies e uniformidade de cada amostra de solo analisada. No primeiro (T1), décimo sexto (T16) e vigésimo nono (T29) dias de tratamento.....	77
Tabela 11 – Condições experimentais para os ensaios de deslocamento miscível do KBr nos dois solos nas vazões de 0,2; 0,45 e $0,7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$	79
Tabela 12 - Condições experimentais e parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com KBr nos solos Recife e Macon.....	82
Tabela 13 – Valores médios das condições experimentais e dos parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com SMX nos solo Recife e Macon, nas vazões de três vazões estudadas e nas concentrações 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M, respectivamente.	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular das sulfonamidas	20
Figura 2 - Possíveis vias de exposição ambiental devido ao uso de medicamentos. (Fonte: Doretto, 2012).....	22
Figura 3 - Mecanismo de dispersão hidrodinâmica em escala microscópica.....	26
Figura 4 - Estrutura química do SMX e seus possíveis metabólitos previstos por duas vias de biodegradação aeróbicas (A) de acordo com biocatálise (Gao et al., 2010) e (B) de acordo com Gauthier et al. (2010). Metabólitos marcados em cinza (Müller et al, 2013).....	36
Figura 5 - Cinética de sorção do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.....	55
Figura 6 - Cinética de sorção de primeira ordem do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.	56
Figura 7 - Cinética de sorção de segunda ordem do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.	57
Figura 8 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Macon não estéril (a) e estéril (b).....	58
Figura 9 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Recife não estéril (c) e estéril (d).....	59
Figura 10 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Macon não estéril (c) e estéril (d).	60
Figura 11 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Recife não estéril (c) e estéril (d).....	61
Figura 12 - Sorção do SMX em função do pH.	62
Figura 13 Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de bio- degradação do SMX em solo Macon estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-4} M.	64
Figura 14 – Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de bio- degradação do SMX em solo Macon estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-5} M.	65
Figura 15 - Modelagem dupla cinética aplicadas aos dados experimentais de bio- degradação do SMX em solo Recife estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-4} M.	66

Figura 16 – Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de biodegradação do SMX em solo Recife estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-4} M.	67
Figura 17 - Crescimento das bactérias totais cultiváveis [T], resistentes [R] e degradadoras [D] do SMX, em placas de petri no solo Macon. Em contato com o solo uma solução de SMX nas concentrações 10^{-3} M (a), 10^{-4} M (b), 10^{-5} M (c) e sem adição de SMX (d)	70
Figura 18 - Crescimento das bactérias totais cultiváveis [T], resistentes [R] e degradadoras [D] do SMX, em placas de petri no solo Recife. Em contato com o solo uma solução de SMX nas concentrações 10^{-3} M (a), 10^{-4} M (b), 10^{-5} M (c) e sem adição de SMX (d)	71
Figura 19 - Árvore filogenética representando a afiliação taxonômica dos 60 isolados resistentes ao SMX do solo Macon (quadrado) e Recife (círculo) 30 dias de incubação com SMX 0,1 mM.	73
Figura 20 - PCR-DGGE da região hipervariável V4 de RNAr 16S gene codificando comunidades bacterianas do solo temperado (MA) e do solo tropical (RE) com ou sem tratamento com 0,1 e 1 mM de SMX nos tempos de 1, 15 e 30 dias. As bandas indicadas pelas setas 1 e 2	74
Figura 21– Endograma desenvolvido pelo método UPGMA agrupando os perfis de DGGE mais semelhantes	75
Figura 22 – Biodegradação do SMX pela cepa RE-490, RE-477 et E.coli DH5 α . A concentração inicial do SMX de 6 mg/L.	77
Figura 23 – Árvore filogenética representando a filiação taxonômica dos isolados RE-477 e RE-490.	78
Figura 24- Curvas médias de eluição do KBr ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min $^{-1}$ e na concentração de 1,0 g L $^{-1}$	80
Figura 25 - Curvas médias de eluição do KBr ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min $^{-1}$ e na concentração de 1,0 g.L $^{-1}$.	81
Figura 26 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10^{-3} M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL.min $^{-1}$	84
Figura 27 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10^{-3} M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min.	85
Figura 28 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10^{-5} M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min.	86
Figura 29 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-3} M nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 mL/min.	87

Figura 30 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-4} M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min..... 88

Figura 31- Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-5} M nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 mL/min. 89

1. INTRODUÇÃO

O alerta que traz o quarto Relatório Mundial das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento de Recursos Hídricos é que “na medida em que cresce a demanda de recursos hídricos no mundo, diminui a probabilidade do fornecimento de água doce em muitas regiões, como consequência da mudança climática” (WWDR4, 2102).

A agricultura, a produção de energia, os usos industriais e o consumo humano são basicamente responsáveis pela totalidade da demanda de água. A agricultura e a pecuária fazem uso intensivo de água. Somente a agricultura responde por 70% da quantidade total de água e requer água de boa qualidade para diversos processos de produção. O crescimento importante da demanda por produtos pecuários, em especial, está provocando um aumento da demanda por água. Estima-se que a demanda mundial por alimentos cresça cerca de 70% até 2050. (WWDR4, 2102)

O crescimento mundial da população e da demanda por alimentos e os efeitos da mudança climática em nível mundial vêm exercendo uma enorme pressão sobre os recursos naturais em particular sobre a água. A água é um componente necessário para todos os principais setores socioeconômicos, contribuindo para cada um de diferentes maneiras. O acesso ao abastecimento de água potável e de saneamento básico é necessário para a manutenção da saúde pública (Chirnside et al 2009).

O mercado mundial de alimentos está sendo cada vez mais impulsionado pela mudança nas dietas e padrões de consumo de alimentos na direção de produtos de origem animal (FAO, 2006). Em 2008, 3.350 milhões de hectares foram usados como pastagem - mais de duas vezes a área usada para cultivos aráveis e culturas permanentes. A pecuária fornece não apenas a carne, mas também produtos lácteos, ovos, lã, couro e assim por diante. O setor pecuário está mudando a um ritmo sem precedentes em função da demanda, nas economias com as maiores taxas de crescimento do mundo, por alimentos de origem animal (Steinfeld et al., 2006). A pecuária já contribui com 40% do valor global da produção agrícola; e constitui uma das partes mais dinâmicas da economia agrícola, impulsionada pelo crescimento da população, o aumento do poder aquisitivo e a urbanização.

Os antibióticos são utilizados extensivamente na medicina humana e veterinária, assim como na aquicultura, com a finalidade de prevenir (profilaxia) ou no tratamento de infecções microbianas. Várias centenas de substâncias antibióticas e antimicóticas

diferentes são usadas na medicina humana e veterinária; por exemplo, mais de 250 na Alemanha (Kummerer e Henninger, 2003). Wise (2002) estimou que a quantidade de antibiótico utilizado em todo o mundo era de 100.000 a 200.000 toneladas por ano.

Dos antibióticos utilizados na União Européia e na Suíça, 65% foram aplicados na medicina humana. Nos Estados Unidos, estima-se que 50% das 22.700 toneladas de todos os antimicrobianos prescritos anualmente são para os seres humanos e 50% para uso em animais, agricultura e aquicultura (Kummerer, 2009). Um relatório mais recente estimou que os produtores de gado norte-americanos utilizam cerca de 11.200 toneladas de agentes antimicrobianos para fins não terapêuticos principalmente para promover o crescimento do gado, porcos e aves. Os usos clínicos são estimados em cerca de 10% do total de uso de antimicrobianos (Union of Concerned Scientists, 2001).

Águas contaminadas também podem facilitar a transmissão de doenças quando águas residuais efluentes das estações de tratamento de esgoto são usadas para irrigar ou fertilizar as plantações. Essa prática é cada vez mais utilizada em muitas áreas peri-urbanas do mundo, especialmente aquelas em zonas áridas e semiáridas caracterizadas por uma intensa competição por água entre a agricultura e usos urbanos, e, combinado com a mudança dos hábitos alimentares das populações urbanas, representa uma verdadeira ameaça à saúde (Drechsel et al., 2010).

Nos últimos anos uma grande variedade de resíduos de fármacos tem sido detectada no meio ambiente. A ocorrência desses compostos, designados por contaminantes emergentes, tem despertado preocupação, pois eles são compostos bioativos, ou seja, são sintetizados para uma intenção específica nos seres vivos. A principal entrada desses produtos no meio ambiente resulta de sua utilização na medicina humana e veterinária, uma vez que após a administração são parcialmente metabolizados e excretados. Isto é decorrente do fato de que os fármacos são desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir ao propósito terapêutico (Pedroso et al., 2012).

Poucos estudos têm sido realizado com o conjunto das interações físico-químicas, da degradação, do impacto associado à resistência bacteriana, e do transporte de um antibiótico em solos oriundos de diferentes condições climáticas (tropical e temperada).

Deve-se ressaltar que o presente trabalho foi desenvolvido em regime de cotutela e se insere no seguimento de pesquisa relativa ao Estudo das Interações, dos Mecanismos de biodegradação, por microrganismos específicos, e do transporte de compostos orgânicos

em solos urbanos do projeto de cooperação internacional CAPES/COFECUB, N° 677/10, intitulado “Transferência e transformação de metais pesados e hidrocarbonetos em solos antropizados (TRANSMETH)”, convênio entre a Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, por meio dos departamentos de Energia Nuclear (DEN), de Engenharia Civil (DECIV), de Engenharia Química (DEQ), de Antibióticos (DANTI) e de Química Fundamental (DQF); a Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE - através dos Departamentos de Agronomia (DEPA) e de Tecnologia Rural (DTR) e entre Grenoble Universités – GU (Institut National Polytechnique e UJF - Université Joseph Fourier) através do Laboratoire d'études des Transferts en Hydrologie et Environnement (LTHE) e do Laboratoire de Géotechnique Interne e Tectonophysique (LGIT) (Grenoble, França); a École Nationale Supérieure des Travaux Publics de l'État através do Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) (Lyon, França).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Em um contexto de exploração excessiva dos ambientes naturais, levando à degradação da sua qualidade de hidro-bio-geoquímica, o objetivo geral da tese são avaliar o destino e o impacto dos antibióticos no solo. Mais especificamente, é estudar as interações físicas e químicas, o impacto biológico associados à resistência bacteriana e transporte de um antibiótico, sulfametoxazol (SMX) em dois solos pedológica próximos (siltosos) mas, distintos em origem geográfica (Recife, Brasil e Macon, França) e condições climáticas (tropicais e temperadas).

2.2 Específicos

- i) Estudar a sorção do SMX em dois solos e compreender os mecanismos envolvidos e os efeitos importantes, tal como o pH;
- ii) Analisar o impacto do SMX sob as populações microbianas nos dois solos em termos quantitativos (enumeração) e qualitativos (biodiversidade) e sob a evolução temporal das bactérias heterotróficas totais cultiváveis e resistentes ao SMX;
- iii) A avaliação do efeito do tipo do solo e da concentração do antibiótico aplicado nas cinéticas de degradação da molécula do SMX e nos mecanismos envolvidos;
- iv) Estudar as cinéticas e os processos de transferência do SMX em colunas de solo para avaliar sua mobilidade e o risco de disseminação e de contaminação das águas naturais.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Antibióticos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (Walsh, 2003).

Os antibióticos são definidos como de ocorrência natural, compostos semi-sintéticos e sintéticos com atividade antimicrobiana que podem ser aplicados por via parental, por via oral ou tópica (Kemper, 2007).

Antibiótico num sentido mais amplo é um agente quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários (Kümmerer, 2009).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, entre outros. Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas.

O uso extensivo de medicamentos de uso veterinário é suposto ser um risco assustador para a saúde pública resultando não apenas no surgimento e propagação de bactérias resistentes, mas também em outros prejuízos para os seres humanos, os animais e o meio ambiente. Na medicina humana, bem como na veterinária, os antibióticos são utilizados para tratar e prevenir a doença (Kemper, 2007).

Os principais grupos de importantes antibióticos administrados na medicina humana e veterinária estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Importantes antibióticos na medicina humana e animal (Fonte: Kemper, 2008).

CLASSE	COMPOSTO	USO PRIMÁRIO	POTENCIAIS EFEITOS COLATERAIS
Aminoglicosídeos	Apramicina	Apenas porcos	
	Gentamicina	Todos os animais, os seres humanos.	Neurotóxico
	Canamicina	Cães, porcos, gado, cavalos.	Nefrotóxico
	Neomicina	Todos os animais	Ototóxicos, nefrotóxicos
	Sisomicina	Apenas Humanas	
	Spectinomomicina	Porcos, gado, aves de capoeira, carneiros.	Ototóxicos, nefrotóxicos
	Estreptomicina	Obsoletos	
β-Lactamas: penicilinas	Amoxicilina	Todos os animais	
	Ampicilina	Todos os animais	
	Azlocilin	Seres humanos	
	Benzil-penicilina	Todos os animais	
	Cloxacilina	Gado	
	Flucloxacilina	Gado	
	Meticilina	Seres humanos	Reações alérgicas
	Mezlocilina	Seres humanos	
	Nafcilina	Seres humanos	
	Oxacilina	Seres humanos	
	Piperacilina	Gado	
	Phenoxymethyl cilina	Seres humanos	
	Penicilina g	Seres humanos	
Cefalosporinas	Cefalexina	Cães	
	Cefalotina	Seres humanos	
	Cefazolina	Seres humanos	
	Ceftiofur	Bovinos, suínos	Reações alérgicas cruzadas para β-la
	Cefotaxima	Seres humanos	
	Cefotiam	Seres humanos	
	Cefquinom	Bovinos, suínos	
Fenicóis	Cloranfenicol	Gatos, cães	Anemia
Fluoroquinolones	Ciprofloxacina	Seres humanos	
	Enrofloxacin	Todos os animais	
	Marbofloxacina	Todos os animais	Artropatias em animais jovens
	Flumequin	Seres humanos	
	Ofloxacina	Seres humanos	
Lincosaminas	Clidamicina	Cães, seres humanos.	Problemas Gastrointestinais
	Lincomicina	Porcos, cães, gatos, bovinos.	
Macrolídeos	Azitromicina	Seres humanos	
	Claritromicina	Seres humanos	
	Eritromicina	Seres humanos, gado, galinha.	
	Roxitromicina	Seres humanos	
	Espiramicina	Todos os animais	
	Tilosina	Apenas animais	
	Vancomicina	Seres humanos	
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Seres humanos	
	Sulfadimetoxina	Gado, porcos, frango.	
	Adimidina	Gado, ovelha, galinha.	
	Sulfametoxazol	Seres humanos	Nefrotóxico
	Sulfapiridina	Porcos	
	Sulfatiazol	Seres humanos	
Trimetoprima		Em combinação com sulfonamidas	

Tetraciclinas	Clortetraciclina	Gados,porcos	Hepatotóxico
	Doxiciclina	Seres humanos,gatos, cães.	
	Oxitetraciclina	Seres humanos,gado,ovelhas, porcos.	
	Tetraciclina	Seres humanos,cavalos,ovelhas, porcos.	

3.2 Sulfonamidas

Dentre os antibióticos sintéticos, as sulfonamidas (SAs) (Figura 1) são uma classe de antibióticos de amplo espectro, que são sintetizados artificialmente. Devido ao seu baixo custo e à eficiência relativa na luta contra muitas infecções bacterianas comuns, sulfonamidas são amplamente usados na medicina humana e veterinária, piscicultura, criação de animais, etc. Recentemente, verificou-se que os antibióticos e os seus metabólitos podem promover resistência bacteriana e causar poluição ecológica. A excreção das sulfonamidas não metabolizadas nas fezes e urina de seres humanos e animais é uma das principais fontes de introdução desses antibióticos para o ecossistema aquático (Guo et al, 2014).

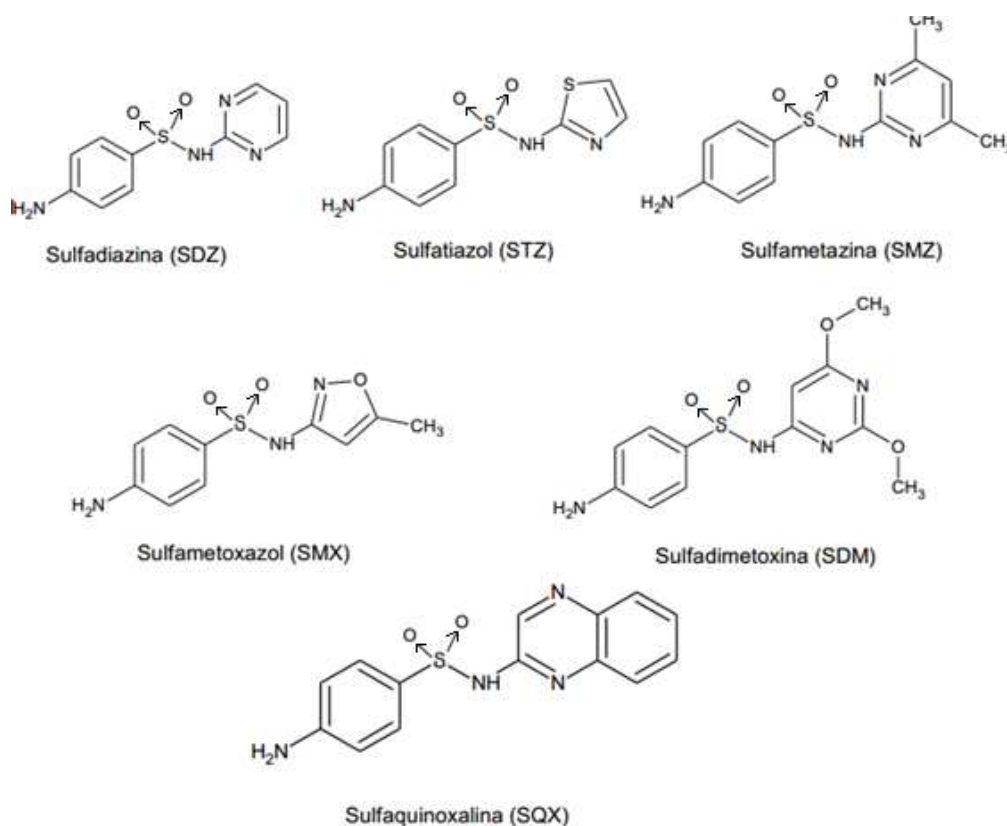


Figura 1 - Estrutura molecular das sulfonamidas

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se aos derivados do *para*-amino-benzeno-sulfonamida (sulfanilamida). O grupo *p*-NH₂ desses compostos é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de serem convertidos *in vivo* em grupos amino livre. Essas substituições possuem efeitos variáveis sobre a atividade antibacteriana da molécula. As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e impedem a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico ou vitamina B9. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico, precursor imediato do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico; as bactérias capazes de utilizar o folato pré-formado não são afetadas (Santos et al., 2011; Gilman et al., 2006).

Os valores de algumas propriedades físico-químicas das sulfonamidas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de algumas propriedades físico-químicas de sulfonamidas.

Antimicrobiano	Forma Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	pK _a	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	LogK _{ow}	Pressão de vapor (mm Hg)	Constante de Henry (atm m ³ mol ⁻¹)
Sulfadiazina	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250,3	2,0/6,4		-0,09		
Sulfadimetoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,3	3,0/6,2	340	1,63	1,60·10 ⁻⁹	1,3·10 ⁻⁴
Sulfametazina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,3	1,6/7,4	1500	0,80	3,64·10 ⁻¹¹	3,09·10 ⁻¹¹
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,3	1,60/5,7	600	0,89		
Sulfaquinoxalina	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	300,3	2,3/6,0	120	1,68	3,00·10 ⁻¹⁰	6,68·10 ⁻¹¹
Sulfatiazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,3	2,2/7,2		0,05		

pK_a = potencial da constante de acidez. logK_{ow} = Constante de partição octanol-água

3.3 Vias de entrada e ocorrência de antibióticos no ambiente

As principais vias de contaminação de ambientes terrestres e aquáticos com resíduos de fármacos de uso humano e veterinário são apresentadas na Figura 2

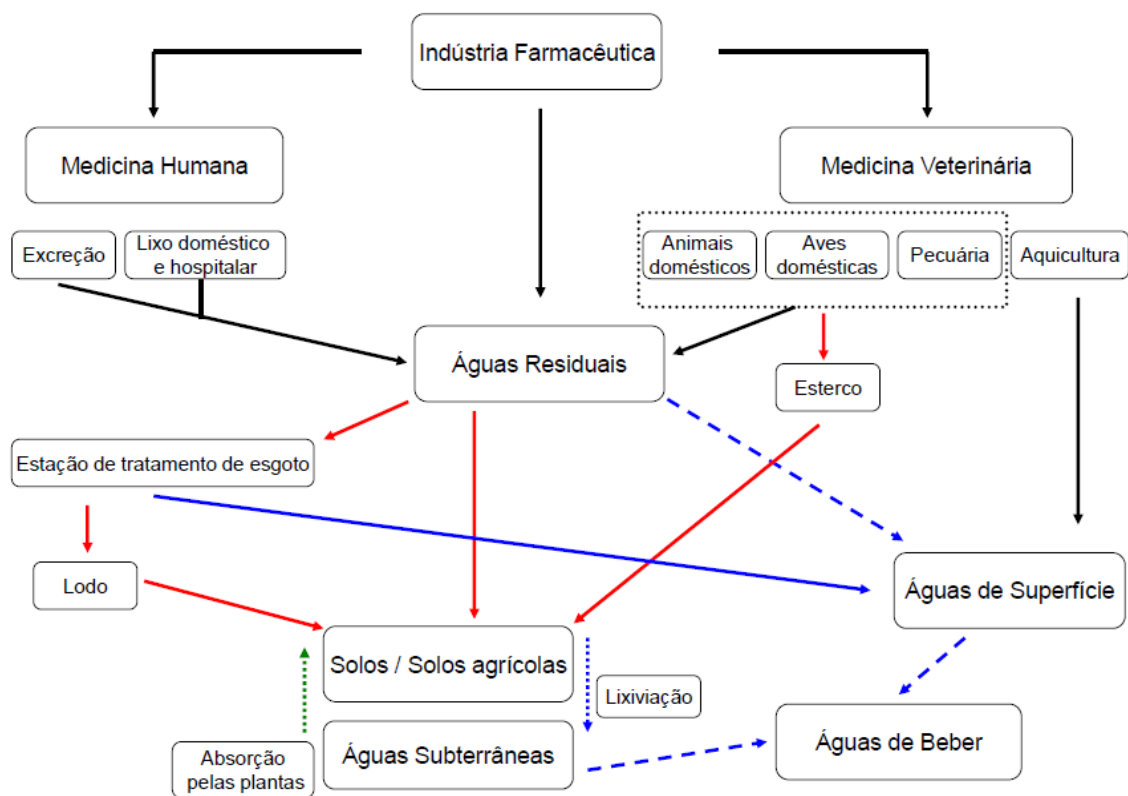


Figura 2 - Possíveis vias de exposição ambiental devido ao uso de medicamentos.
(Fonte: Doretto, 2012)

Resíduos de sulfonamidas de uso veterinário têm sido detectados em amostras de esterco (De Liguoro et al., 2007; Martínez-Carballo et al., 2007), solo (Hamscher et al., 2005), água superficial (Christian et al., 2003; Lindsey et al., 2001; Hirsch et al., 1999; Kolpin et al., 2002), água subterrânea (Hirsch et al., 1999; Lindsey et al., 2001) e planta (Dollivier et al., 2007). Informações sobre a ocorrência e as concentrações médias de resíduos de sulfonamidas de uso veterinário em diferentes matrizes ambientais encontram-se na Tabela 3. De modo geral, as concentrações ambientais são relativamente baixas (ng ou µg por quilograma ou por litro).

Tabela 3- Concentrações de sulfonamidas encontradas na natureza.

Antibiótico	Concentração Média	Matriz	Localidade	Referência
Sulfametoxazol	Até 98 ng L ⁻¹	Água superficial	Noroeste da Alemanha	Christian et al. (2003)
	0,22 µg L ⁻¹	Água subterrânea	EUA	Lindsey et al. (2001)
	1,02 µg L ⁻¹	Água superficial	EUA	Lindsey et al. (2001)
	0,47 µg L ⁻¹	Água subterrânea	Alemanha	Hirsch et al. (1999)
	30 – 85 ng L ⁻¹	Água superficial	Alemanha	Harting et al. (1999)
	0,3– 1,5 µg L ⁻¹	Efluente de ETE	Alemanha	Harting et al. (1999)
	0,006 – 0,15 µg L ⁻¹	Água natural	EUA	Kolpin et al. (2002)
	410 ng L ⁻¹	Água subterrânea	Alemanha	Sacher et al. (2001)
	0,4 µg L ⁻¹	Efluente de ETE	Alemanha	Hirsche et al. (1999)
	0,03 µg L ⁻¹	Água superficial	Alemanha	Hirsche et al. (1999)
Sufadimetoxina	0,06-15 µg L ⁻¹	Água superficial	EUA	Lindsey et al. (2001)
	390 µg kg ⁻¹	Esterco Bovino	Itália	De liguoro et al. (2007)
Sulfametazina	0,22 µg L ⁻¹	Água superficial	EUA	Lindsey et al. (2001)
	0,16 µg L ⁻¹	Água subterrânea	Alemanha	Hirsch et al. (1999)
	2,0 µg kg ⁻¹	Solo	Alemanha	Hamscher et al. (2005)
	1,2 mg kg ⁻¹	Planta (milho)	EUA	Dolliver et al. (2007)
Sulfatiazol	0,08 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey et al. (2001)
Sulfadiazina	51 mg kg ⁻¹	Esterco de frango	Australia	Martínes-Carballo et al. (2007)
	91 mg kg ⁻¹	Esterco de peru		

3.4 Transferência de solutos no solo

Quando a água se movimenta no solo ela arrasta os solutos pelo fluxo de massa, sendo que parte poderá ser adsorvida em outros locais, parte poderá ser absorvida pelas plantas, ou mesmo ser precipitada quando sua concentração excede sua solubilidade, como acontece na superfície do solo durante a evaporação. Mas os solutos não se movem somente com a água no solo, eles também podem se dispersar/difundir na mesma, em resposta a gradientes de concentração (Prevedello, 1996).

3.4.1 Fatores que afetam a dinâmica de solutos e seu tempo de permanência no solo

Alguns modelos analíticos e numéricos estão disponíveis para o estudo dos processos de transferência da água e/ou do soluto entre a superfície do solo e o lençol freático. Desses, a maioria dos modelos utiliza a equação de Richards para o fluxo não

saturado, e a equação de Fick para a convecção-dispersão do transporte do soluto (Šimůnek et al., 1999).

Os antibióticos, ao se movimentarem no solo, podem seguir diferentes caminhos, reagindo entre si e interagindo com a matriz do solo numa sucessão de processos físicos e químicos inter-relacionados, ou seja, podem ser sorvidos aos colóides minerais e orgânicos ou liberados na solução do solo através de um processo conhecido como dessorção. As moléculas presentes na solução do solo podem ser absorvidas pelas raízes das plantas, lixiviadas para as camadas mais profundas do solo ou volatilizadas (Prata, 2002).

Os mecanismos envolvidos na lixiviação dos contaminantes são a sorção e a dessorção, pois esses processos influenciam na concentração destas moléculas presentes na solução do solo e, conseqüentemente, na dissipação destes compostos no solo (Barizon, 2006). A sorção é influenciada por uma série de fatores, como pH, temperatura, potencial de oxi-redução, composição e concentração da solução do solo. Além disso, deve-se considerar que determinados solutos podem sofrer transformações biológicas pela fauna e pela flora do solo (Prevedello, 1996).

3.4.2 Processos de transporte de solutos no solo

Os solutos no solo podem se movimentar convectivamente (fluxo de massa) e por dispersão/difusão, além de estarem sujeitos aos processos de perdas e ganhos e os de transformações químicas e/ou biológicas. Os processos de transformação que os solutos estão sujeitos no solo são dependentes da natureza e da propriedade de cada meio e do soluto envolvido (Prevedello, 1996).

Três processos controlam o transporte do soluto e/ou substâncias químicas no solo: convecção ou advecção, difusão molecular e dispersão hidrodinâmica (Hillel, 1998).

3.4.2.1 Convecção ou advecção

O transporte convectivo refere-se ao movimento de soluto transportado com a água, sendo o transporte de soluto proporcional à sua concentração, podendo ser descrito por:

$$J_c = qc = -c \left[K(\theta) \frac{\partial H}{\partial z} \right] \quad (3.3)$$

Na equação 3.3 q é a densidade de fluxo da água, c é a concentração de soluto (massa de soluto por unidade de volume da solução), H é o potencial total e J_c é o fluxo convectivo de solutos em termos de massa de soluto que passa por unidade de área de solo e de tempo.

3.4.2.2 Difusão molecular

De acordo com Hillel (1998), a difusão do soluto no solo ocorre devido ao gradiente de concentração. Como resultado, mais partículas tendem a se movimentar de pontos de maior concentração para pontos de menor concentração. A taxa de difusão J_d é expressa pela primeira lei de Fick, escrita como:

$$J_d = -D_0 \frac{\partial c}{\partial z} \quad (3.4)$$

Na qual, J_d é a quantidade de íons difundidos por unidade de tempo, D_0 é o coeficiente de difusão molecular na água e $\partial c / \partial z$ é o gradiente de concentração do soluto.

Para a difusão molecular na fase líquida do solo (D_s), o coeficiente de difusão é geralmente menor que o coeficiente de difusão molecular na água (D_0). Dois fatores afetam o coeficiente de difusão no solo: a tortuosidade do solo (ξ), pois o comprimento real dos poros é significativamente maior que uma aparente distância em linha reta, e a umidade volumétrica do solo (θ), pois a fase líquida ocupa apenas uma fração do volume do solo. O coeficiente de difusão no solo é dado por:

$$D_s = D_0 \cdot \theta \cdot \xi \quad (3.5)$$

A tortuosidade (ξ) é um parâmetro empírico ($\xi < 1$) e depende da fração de volume da fase líquida, cujo valor diminui com o decréscimo de θ .

3.4.2.3 Dispersão hidrodinâmica

O movimento de uma solução nos poros do solo traz outro processo que difere do mecanismo de difusão, mas tem um efeito análogo. Este processo, que às vezes predomina sobre a difusão, chamado de dispersão hidrodinâmica é resultado das variações da velocidade do fluido dentro do meio poroso. Isto é devido ao fato de que as moléculas do soluto que estão mais próximas das paredes dos grãos do solo movem-se mais lentamente quando comparadas às moléculas presentes no centro do poro (Figura 3a). Dessa forma, a solução move-se mais rapidamente em poros com maiores diâmetros (Figura 3b).

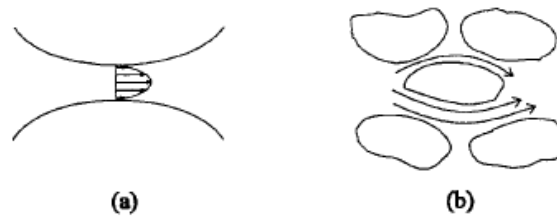


Figura 3 - Mecanismo de dispersão hidrodinâmica em escala microscópica.

Matematicamente, a dispersão hidrodinâmica pode ser formulada de maneira análoga ao processo de difusão dado pela equação 3.4, diferindo apenas no coeficiente de difusão (D_s), que é substituído pelo coeficiente de dispersão (D_h), o qual é uma função da velocidade média da água nos poros.

$$D_h = \lambda v \quad (3.6)$$

Na equação 3.6, v é a velocidade média da água nos poros e λ é a dispersividade.

Devido à similaridade dos efeitos entre difusão e dispersão, é natural assumi-los como sendo aditivos. Consequentemente, os coeficientes de difusão e dispersão são frequentemente combinados em um único termo, chamado de coeficiente de dispersão hidrodinâmica.

$$D(\theta, v) = D_s(\theta) + D_h(v) \quad (3.7)$$

3.4.2.4 Modelo de convecção-dispersão (CDE)

O fluxo total de soluto J , em um volume elementar representativo do solo é igual ao fluxo convectivo, J_c , mais o fluxo difusivo-dispersivo, J_d (Jury & Roth, 1990):

$$J = J_d + J_c = - \left[D \frac{\partial c}{\partial z} + qc \right] \quad (3.8)$$

É importante estudar as variações de concentração do soluto em determinado ponto do solo, em função do tempo. Portanto, faz-se necessária a equação de transferência para o soluto, que é obtida pela combinação da equação de continuidade e de fluxo.

$$\frac{\partial(\theta c)}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial z} \quad (3.9)$$

Para um soluto não interativo com a matriz sólida do solo, a equação de convecção-dispersão (CDE) é obtida substituindo a equação 3.8 na equação 3.9:

$$\frac{\partial \theta c}{\partial t} = - \frac{\partial}{\partial z} \left[- \theta D \frac{\partial c}{\partial z} + qc \right] \quad (3.10)$$

A equação de convecção-dispersão (CDE) para a transferência de soluto interativo com a matriz sólida do solo, em solos homogêneos, pode ser escrita como:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\theta c + \rho_d S) = \frac{\partial}{\partial z} \left(\theta D \frac{\partial c}{\partial z} - qc \right) \quad (3.11)$$

Na equação 3.11, ρ_d é a massa específica do solo e S é a concentração de soluto adsorvida na fase sólida.

A relação entre a concentração de soluto na fase líquida e na fase sólida é denominada de isoterma de adsorção e pode ser descrita pela equação 3.12, na qual K_D é o coeficiente de partição solo-solução, η e β' são coeficientes empíricos que determinam três tipos diferentes de isoterma de adsorção: a isoterma de Freundlich ($\eta = 0$), a

isoterma de adsorção de Langmuir ($\beta' = 1$) e a isoterma de adsorção linear ($\eta = 0$ e $\beta = 1$).

$$S = \frac{K_D \cdot c^{\beta'}}{1 + \eta c^{\beta'}} \quad (3.12)$$

A adsorção do soluto pela fase sólida pode ser descrita com uma isoterma de adsorção linear, em que a equação 3.12 torna-se:

$$S = K_D \cdot c \quad (3.13)$$

Considerando que a transferência de água ocorre em regime permanente e substituindo-se a equação da isoterma de adsorção linear (Eq 3.13) na equação de convecção-dispersão (Eq 3.11), obtém-se:

$$R \frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - v \frac{\partial c}{\partial z} \quad (3.14)$$

Na equação 3.14 v é a velocidade média da água nos poros ($v = q/\theta$) e R é o fator de retardo dado por:

$$R = 1 + \frac{\rho_d \cdot K_D}{\theta} \quad (3.15)$$

O modelo de convecção-dispersão (CDE), também chamado de modelo de uma região, é o modelo clássico do transporte unidimensional de solutos em meios porosos homogêneos, sob condições isotérmicas.

3.4.2.5 Modelo de convecção-dispersão a duas frações de água (CDE-MIM)

Este é um modelo mais complexo por incluir um fluxo preferencial de solutos em solos heterogêneos representando o espaço poroso afetado pela circulação da solução

como dividido em duas regiões, uma cujo conteúdo de água móvel é θ_m e a outra cujo conteúdo de água imóvel é θ_{im} (Comegna et al., 2001), portanto:

$$\theta = \theta_m + \theta_{im} \quad (3.16)$$

As concentrações de solutos são definidas como:

- Concentração de solutos na fase líquida móvel – representa a quantidade de soluto n_m contida em um volume de água móvel V_{wm} contido no solo, conforme a equação 3.17:

$$c_m = \frac{n_m}{V_{wm}} \quad (3.17)$$

- Concentração de solutos na fase líquida imóvel – representa a quantidade de soluto n_{im} presente em um volume de água imóvel V_{wim} conforme a equação 3.18:

$$c_{im} = \frac{n_{im}}{V_{wim}} \quad (3.18)$$

- Concentração total de soluto: representa a quantidade total de soluto n presente no volume total de água V_w contido no solo, conforme a equação 3.19:

$$c = \frac{n}{V_a} \quad (3.19)$$

Neste caso, a concentração c será a soma das componentes móveis e imóveis. Pode-se definir:

$$\theta \cdot c = \theta_m \cdot c_m + \theta_{im} \cdot c_{im} \quad (3.20)$$

O transporte de água e de soluto em um meio poroso, em que parte da fase líquida é imóvel, conduz a equação de convecção-dispersão a duas regiões de água, ou modelo

CDE-MIM. Combinando a equação 3.20 com a equação da continuidade (Eq3.10) tem-se:

$$\frac{\partial \theta_m \cdot c_m}{\partial t} + \frac{\partial \theta_{im} \cdot c_{im}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left(\theta_m D_m \frac{\partial c_m}{\partial z} + \theta_{im} D_{im} \frac{\partial c_{im}}{\partial z} \right) - v_m \frac{\partial \theta_m c_m}{\partial t} \quad (3.21)$$

Na equação 3.21, v é a velocidade média da água nos poros da fase móvel, D_m e D_{im} são os coeficientes de difusão-dispersão nas fases móvel e imóvel, que dependem do teor de umidade do solo, da velocidade de escoamento e da tortuosidade do meio poroso.

Segundo Brusseau (1993), a difusão molecular (predominante na fase imóvel) é pequena diante da dispersão hidrodinâmica e, portanto, D_{im} é considerada desprezível, simplificando a equação 3.20 em:

$$\frac{\partial \theta_m \cdot c_m}{\partial t} + \frac{\partial \theta_{im} \cdot c_{im}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left(\theta_m D_m \frac{\partial c_m}{\partial z} \right) - v_m \frac{\partial \theta_m c_m}{\partial z} \quad (3.22)$$

Uma relação que descreve a troca de massa de solutos entre as duas regiões de água móvel e imóvel, definida por uma cinética de primeira ordem, é dada pela equação 3.23, na qual α é o coeficiente de transferência de massa entre as duas frações de água (Jaynes et al., 1995):

$$\theta_{im} \frac{\partial c_{im}}{\partial t} = \alpha (c_m - c_{im}) \quad (3.23)$$

3.4.2.6 Modelo de convecção-dispersão a dois sítios de sorção

O modelo de não-equilíbrio químico considera que a sorção em alguns sítios é instantânea, enquanto que a sorção nos sítios restantes é governada por cinética de primeira ordem (Selim et al., 1976; Cameron; Klute, 1977). Na forma adimensional, o modelo que representa o não-equilíbrio químico a dois sítios de sorção é dado por:

$$\beta R \frac{\partial c_1}{\partial T} + (1 - \beta) R \frac{\partial c_2}{\partial T} + \mu_1 c_1 = \frac{1}{P} \frac{\partial^2 c_1}{\partial z^2} - \frac{\partial c_1}{\partial z} \quad (3.24)$$

$$(1-\beta)R \frac{\partial c_2}{\partial T} = \omega(c_1 - c_2) \quad (3.25)$$

Os fatores C_1 e C_2 são as concentrações no sítio em equilíbrio e não-equilíbrio respectivamente; $T = vt/L$ é o tempo adimensionalizado, $z = x/L$ é a coordenada espacial adimensionalizada, $P = vL/D$ é o número de Peclet; μ_l é a constante de degradação; β é o coeficiente de partição entre os dois sítios de sorção; ω é o número de Damköhler, representando o coeficiente de transferência de massa adimensionalizado. Para o modelo de dois sítios de sorção β e ω são definidos como:

$$\beta = \frac{\theta + \rho_d f K_D}{\theta + \rho_d K_D} \quad (3.26)$$

$$\omega = \frac{\alpha(1-\beta)RL}{v} \quad (3.27)$$

Na qual, f é a fração de sítios em equilíbrio, α é a taxa de cinética de primeira ordem para os sítios em não-equilíbrio, L é o comprimento da coluna, θ é a umidade volumétrica e v é a velocidade média da água nos poros, ρ_d é a massa específica do solo.

$$D = \lambda \cdot \alpha' + D_s \quad (3.28)$$

Na qual, λ é a dispersividade.

3.5 Tempos característicos do transporte de soluto

São tempos médios definidos a partir dos parâmetros v , D e α , que influenciam no transporte dos solutos. Existem dois principais tempos característicos: O tempo convectivo médio e o tempo de transferência entre as duas regiões de água.

- *Tempo convectivo médio*

Representa o tempo necessário para uma partícula de soluto percorrer uma distancia L (geralmente a profundidade do perfil do solo) com uma velocidade v , sendo a convecção predominante na direção do deslocamento. O tempo convectivo médio é dado por:

$$t_{conv} = \frac{L}{v} \quad (3.29)$$

- *Tempo característico de transferência entre as regiões de água móvel e imóvel*

Caracteriza o tempo necessário para a concentração da fase imóvel entrar em equilíbrio com a fase móvel. Este tempo depende do coeficiente de transferência α e da quantidade de água imóvel.

$$t_{\alpha} = \frac{\theta_{im}}{\alpha} \quad (3.30)$$

3.6 Potencial de lixiviação do SMX

Vários indicadores do potencial de lixiviação de compostos químicos são funções do K_{OC} (ou K_D) como, por exemplo, o fator de retardo R (Davidson et al., 1968), o fator de atenuação AF (*AttenuationFactor*) (RAO et al., 1985), o índice GUS (*GroundwaterUbiquity Score*) (Gustafson, 1989).

O fator de atenuação AF baseia-se nos parâmetros que caracteriza a sorção e degradação dos agroquímicos, na umidade volumétrica de capacidade de campo e no fluxo de água (BERNARD, 2005). O fator de atenuação é determinado por:

$$AF = \exp\left[-(0,693z\theta_{cc}R)/(qDT50)\right] \quad (3.31)$$

Nesta equação, z é a profundidade, θ_{cc} é a umidade volumétrica na capacidade de campo, q é o fluxo de água e $DT50$ (d) é o tempo de meia vida do agroquímico no solo.

O AF representa a fração da massa inicial do herbicida aplicado na superfície do solo que será lixiviado a uma profundidade prescrita no perfil do solo.

O índice GUS tem sido um dos mais utilizados para identificar agroquímicos que possam oferecer risco potencial de contaminação das águas subterrâneas (Ferracini et al., 2001). De acordo com Gustafson (1989), um pesticida apresenta um risco de lixiviação para GUS maior que 1,8. O índice GUS é definido por:

$$GUS = (4 - \log K_{oc}) \log(DT50) \quad (3.32)$$

Uma vez determinado o índice de GUS , o agroquímico é classificado de acordo com os seguintes critérios:

- | | |
|---------------------|----------------------|
| • $GUS < 1,8$ | Não sofre lixiviação |
| • $1,8 < GUS < 2,8$ | Faixa de transição |
| • $GUS \geq 2,8$ | Provável lixiviação |

3.7 Sorção do sulfametoxazol

A sorção é um dos processos mais importantes que afetam o transporte de substâncias químicas para as águas superficiais e subterrâneas, e também desempenha um papel fundamental nas reações de transformação e nas interações microbianas do solo. Assim, um conhecimento profundo sobre os parâmetros que influenciam a sorção de antibióticos pelo solo e os mecanismos associados é um pré-requisito importante para a exposição adequada e avaliação de riscos (Srinivasan et al, 2014a).

A mobilidade dos produtos farmacêuticos no meio ambiente depende essencialmente da sua sorção e dessorção nos sedimentos, e da sua degradação (física e biológica) durante a infiltração. Esses processos afetam claramente a sua biodisponibilidade (Hernandez et al., 2014). Nos últimos 10 anos, vários experimentos investigaram a sorção de produtos farmacêuticos em sedimentos. Alguns deles apontaram uma correlação direta entre a quantidade de matéria orgânica do sedimento e o grau de sorção (Durán-Álvarez et al., 2012, Fenet et al., 2012, Yu et al., 2013). Contudo, outros estudos demonstraram também que as superfícies de sedimentos inorgânicos podem afetar a sorção destes produtos (Schaffer et al. 2012a) e, por

consequente, este processo deve ser levado em consideração, além de particionamento na matéria orgânica natural. Só recentemente, o grau de ionização de alguns grupos funcionais de produtos farmacêuticos ao pH ambiental tem sido reconhecido como um fator adicional que pode controlar a sorção destes compostos em sedimentos naturais (Schaffer et al., 2012b).

Diferentes mecanismos de sorção ocorrem simultaneamente e contribuem para a sorção de contaminantes orgânicos, e a força da interação entre um adsorbato e um adsorvente pode variar de acordo com o mecanismo de sorção (Mitchell e Simpson, 2013).

A sorção dos antibióticos de uso veterinário em solos tem sido demonstrada como uma função de vários atributos, tais como capacidade de troca de cátions, pH e força iônica. Enquanto a partição hidrofóbica tem sido considerada como um dos importantes mecanismos de sorção para uma gama de antibióticos em solos, mecanismos como troca catiônica, pontos catiônicos em superfícies de argila, e ligações de hidrogênio também têm um importante papel na sorção desses compostos em solos e sedimentos.

A sorção das sulfonamidas, por serem compostos anfóteros, podem se apresentar como compostos positivos, neutros ou carregados negativamente (Thiele et al, 2003; Boxall et al., 2002 e Thiele-Bruhn et al., 2003). Elas são altamente dependente do pH, e em um solo de pH na faixa de 4,5-6,5 esse grupo de antibióticos é parcialmente aniônico e parcialmente neutro. A sorção de espécies neutras depende da partição hidrofóbica e é influenciada pela presença de matéria orgânica do solo. No entanto, devido à sua baixa afinidade para adsorção, elas tem o potencial para penetrar mais profundamente no perfil do solo. Isso poderia ser um risco potencial para o lençol freático sob condições favoráveis de lixiviação, como nos dias de chuva intensa (Srinivasan et al., 2014). Primor et al (2008) verificaram que sob condições típicas de pH do solo (pH~7-8), o SMX é carregado negativamente, uma propriedade que pode aumentar a sua velocidade de transporte em meios porosos, devido à exclusão de ânions.

Gao & Pedersen (2010), por sua vez, investigaram a influência do valor do pH (e força iônica) na sorção de sulfonamidas nos minerais de argila. Verificaram que o cátion, em valores de baixo pH, apresentou uma maior afinidade de adsorção, ao passo que as espécies aniônicas (pH = 9) demonstraram pouca ou nenhuma adsorção na esmectita e caulinita.

3.8 Biodegradação

A degradação do SMX por *Phanerochaete chrysosporium* foi demonstrada em meio líquido. A taxa de degradação de SMX foi de 53% após 24 h e atingiu 74% no final da experiência. A lacase, a principal enzima degradadora da lignina produzida por *P. chrysosporium*, estava envolvida no processo de transformação (Guo, et al, 2014).

A eliminação de SMX em lodos ativados foi baseada principalmente na biodegradação, uma vez que a adsorção de SMX foi insignificante. A biodegradação de SMX em condições aeróbias e mesofílicas com dosagem de SMX semi-contínua ou como um co-substrato, ou como a única fonte de carbono e nitrogênio, mostrou que as comunidades de lodos ativados utilizam o SMX como fonte de energia e/ou fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento. Dois grupos de bactérias metabólicas que podem ser responsáveis pela biodegradação do SMX são: (i) as bactérias heterotróficas assimilando SMX-C e/ou SMX-N e (ii) as bactérias autotróficas nitrificantes oxidantes do grupo funcional amino no anel aromático do SMX. A biodegradação do SMX em condições aeróbias e mesofílicas foi aumentada quando as fontes de carbono facilmente degradáveis foram adicionados à medida que se fornecia a energia para o crescimento da biomassa heterotrófica e da atividade metabólica. Além disso, a eficiência de eliminação também foi melhorada em condições de deficiência de nitrogênio. Possíveis vias metabólicas para a biodegradação do SMX (Figura 4) foram selecionadas por meio do banco de dados biocatálise/biodegradação da Universidade de Minnesota (UM-BBD, <http://umbbd.msi.umn.edu>). Isto prediz a probabilidade de reações catabólicas microbianas usando regras de biotransformação derivados de reações encontradas na UM-BBD (Gao et al., 2010). Numa primeira reação catabólica, propôs a clivagem de SMX em 3-amino-5-metil-isoxazole e 4-aminobenzeno-sulfonato, que é realizada por comunidades microbianas específicas. A capacidade de mineralizar o metabolito 4-aminobenzeno-sulfonato tem sido demonstrado que existe em muitos microrganismos. Muito provavelmente, o grupo metilo do 3-amino-5-metil-isoxazol é dividido. No entanto, nenhuma norma metabólica na base de dados descreve a continuação da transformação de 3-amino-isoxazol em isoxazole (Muller et al, 2014).

Presumivelmente, as vias metabólicas serão diferentes, dependendo das condições nutricionais e ambientais. Na presença de fontes de carbono facilmente biodegradáveis, os microrganismos podem ser mais ativos e provocar uma maior quantidade na

biotransformação do SMX. Isso resultaria em, provavelmente, apenas um metabólito principal estável como foi mostrado no lodo ativado, quando acetato foi fornecido para a energia e carbono.

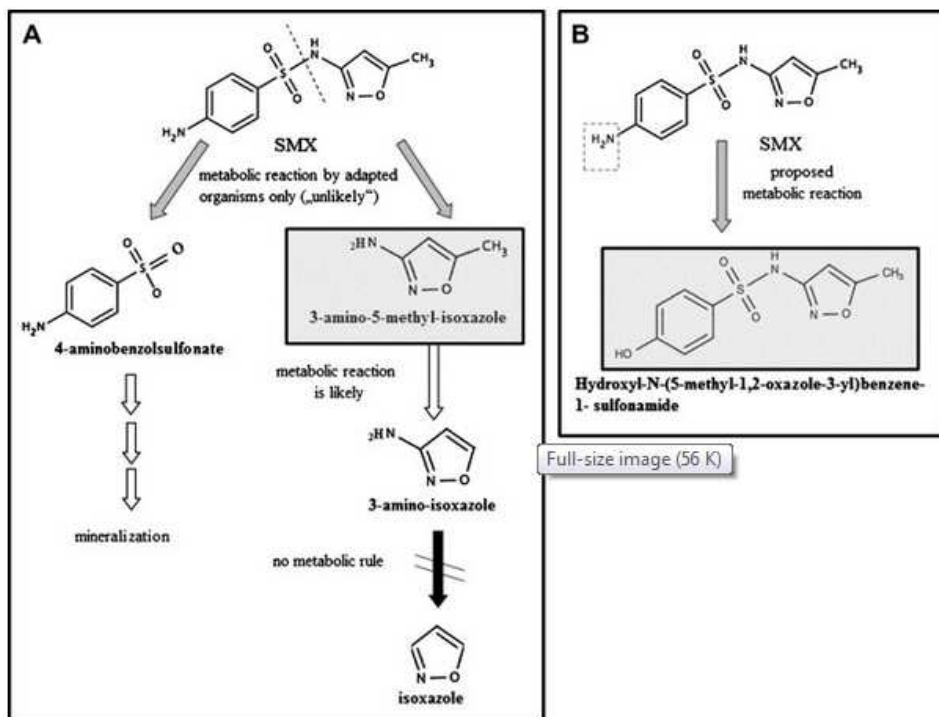


Figura 4 - Estrutura química do SMX e seus possíveis metabólitos previstos por duas vias de biodegradação aeróbicas (A) de acordo com biocatálise (Gao et al., 2010) e (B) de acordo com Gauthier et al. (2010). Metabólitos marcados em cinza (Müller et al, 2013).

3.8.1 Modelagem da biodegradação

A degradação de compostos químicos nos solos é o resultado de uma combinação de produtos químicos e, principalmente, de eventos biológicos (Wu & Nofziger, 1999). Um modelo de degradação de primeira ordem é muitas vezes usado para simular a diminuição da massa residual de um composto químico em um sistema solo após a sua aplicação (Dykaar e Kitanidis, 1996). Se a taxa de primeira ordem for constante ou o tempo de meia-vida permanecer inalterado no processo de degradação, a massa residual da degradação química diminuirá exponencialmente com o tempo (Martins e Mermoud,

1998). Para testes de dissipação, o modelo de primeira ordem (Equação 4.1) é bastante utilizado (Martins e Mermoud, 1998; Scorza e Rigitano, 2009; Chirnside et al., 2009)

$$-\frac{dC}{dt} = k_1 C \quad (4.1)$$

na qual, k_1 é a constante de velocidade de primeira ordem da degradação e C é a concentração do composto no tempo t e é expressa em $[M.L^{-3}]$. O modelo de primeira ordem tem como solução analítica a expressão obtida na Equação 2:

$$C(t) = C_0 e^{-k_1 t} \quad (4.2)$$

Sendo, C_0 é a concentração inicial do composto $[M.L^{-3}]$.

Os modelos de cinética de dupla primeira ordem são descritos na literatura para a degradação de alguns compostos mais complexos, visto que nesse modelo ocorrem duas reações de cinética de primeira ordem (López-Galindo et al., 2010; Gang et al, 2003). Uma primeira reação (Equação 4.3), representando o início da degradação do composto mais rápido e uma segunda reação (Equação 4.4) quando a biodegradação se torna mais lenta.

$$-\frac{dC_R}{dt} = k_R C \quad (4.3)$$

$$-\frac{dC_L}{dt} = k_L C \quad (4.4)$$

Integrando as equações acima com $C_{R0} = fC_0$ e $C_{L0} = (1-f)C_0$, a concentração de um composto no tempo pode ser descrita pela Equação 4.5:

$$C(t) = C_0 \{ f \cdot e^{-K_R t} + (1-f) e^{-K_L t} \} \quad (4.5)$$

Sendo, $C(t)$ é a concentração do composto no tempo t em $[M.L^{-3}]$; C_0 é a concentração inicial do composto $[M.L^{-3}]$; C_{R0} é a concentração inicial do composto que participa da

reação rápida $[M.L^{-3}]$; C_{Lo} é a concentração inicial do composto que participa da reação lenta $[M.L^{-3}]$; f é a fração do composto que foi biodegradado atribuída à reação rápida (adimensional); k_R é a constante de velocidade de primeira ordem da reação rápida ($1/t$); $(1-f)$ representa a fração do composto biodegradado atribuída à reação lenta (adimensional); e k_L é a constante de velocidade de primeira ordem da reação lenta ($1/t$).

3.9 Impacto e indução de resistências

Os antibióticos só são parcialmente removidos em estações de tratamento de águas residuais. Assim, com o aumento do uso, os antibióticos são inevitavelmente lançados no ambiente através dos efluentes de esgoto, excreção nas formas originais ou metabolizados, ou por fertilização do solo com esterco. Deste modo, altas concentrações de sulfonamida, até 20 mg/kg, têm sido encontradas em amostras de estrume. Os efeitos da exposição dos antibióticos aos microrganismos do solo têm sido discutidos em vários estudos. Os efeitos adversos foram encontrados na biomassa e atividade microbiana, assim como no desenvolvimento de resistências aos antibióticos nas comunidades bacterianas. Embora o impacto dos antibióticos em comunidades microbianas no ambiente esteja começando a ser entendido, os efeitos colaterais potenciais em organismos não-alvo, como invertebrados do solo, permanece incerta. As taxas de remoção do SMX são mais baixas quando comparadas a outros antibióticos em instalações de tratamento de águas residuais e sua baixa adsorção no lodo, em solos e em sedimentos aumentam o risco de contaminação ambiental deste antibiótico. Embora os efeitos relatados de concentrações de SMX sobre organismos não-alvo sejam muito maiores do que a sua concentração no ambiente, o risco ecológico do SMX permanece incerto e exige um tratamento urgente, sobretudo considerando que o SMX é mutagênico (Liu et al, 2013).

A descarga de antibióticos no meio ambiente tornou-se uma grande preocupação. Este grupo de produtos farmacêuticos não é apenas propenso a influenciar as comunidades microbianas por seu modo de ação (Fent et al., 2006), mas também por causa do risco de uma dispersão mundial de genes de resistência aos concomitantes (Witte, 2004, Agersø e Petersen, 2007 e Szczepanowski et al., 2009). Programas de monitoramento recentes têm revelado a presença de antibióticos em diferentes compartimentos ambientais, tais como corpos d'água, sedimentos e solos (Heberer,

2002, Thiele-Bruhn e Beck, 2005 e Ternes e Joss, 2007). Além de insumo agrícola (Jjemba, 2002) e de descarga de aterro (Heberer, 2002), os antibióticos entram no meio ambiente principalmente através de águas residuais e estação de tratamento de águas residuárias (ETAR) de efluentes. Substâncias polares de má adsorção, tais como as sulfonamidas são facilmente encontradas em corpos d'água, como águas superficiais (Hirsch et al., 1999), e as águas subterrâneas (Sacher et al., 2001 e Underwood et al., 2011). Os níveis de concentração (Kummerer, 2009) variam desde 370-2000 ng.L⁻¹ em efluentes de águas residuais, 40-1900 ng.L⁻¹ na superfície da água e 20-470 ng.L⁻¹ em águas subterrâneas/banco filtrado até valores da ordem de mg.L⁻¹, em águas subterrâneas altamente contaminadas (Holm et al., 1995) (Müller et al, 2013)

3.10 Transporte reativo

As propriedades químicas do SMX permitem que ele seja transportado no solo por longas distâncias sem ser adsorvido (Lindsey et al., 2001; Perez et al., 2005). Sob a luz solar, o SMX apresenta uma meia vida de 19 dias; entretanto, apresenta-se altamente resistente à biodegradação no subsolo (Lam et al., 2004).

O importante papel da qualidade da matéria orgânica do solo na adsorção de sulfonamidas foi estudado por Thiele (2003), o qual, verificou que a razão para o aumento da adsorção das sulfonamidas quando o teor de matéria orgânica do solo aumentava, era devido aos componentes polares desta que interagiam com os sítios de ligação daquelas.

A migração para horizontes mais profundos de compostos móveis, como o SMX, representa um risco adicional no que tange à contaminação dos recursos hídricos subterrâneos (Kinney et al., 2006; Ternes et al., 2007; Heberer et al., 2008 e Siemens et al., 2010).

Nas áreas urbanas, grandes quantidades de SMX vêm sendo lançadas no solo, redes de esgoto, lagoas e rios. Devido aos baixos valores de K_d das sulfonamidas que são inferiores a 5 L.kg⁻¹, elas são classificadas como de média a grande mobilidade no solo e podem contaminar as águas através do escoamento superficial, drenagem e lixiviação, conforme demonstrado por vários estudos (Christian et al., 2003; Thiele-Bruhn & Aust, 2004; Batt & Aga, 2005).

O transporte de antibióticos fortemente adsorvidos pode ser aumentado pelo fluxo preferencial e pelo transporte facilitado da matéria orgânica dissolvida (Williams et al., 2000; Thiele-Bruhn., 2003; Hoorman et al., 2005), enquanto que a drenagem é uma via principal para o transporte de antibióticos de fraca adsorção. Além desses mecanismos, o transporte facilitado por colóides desempenha um importante papel no transporte das sulfonamidas (Tolls, 2001).

Como a eliminação de antibióticos presentes em águas residuais por meio de tratamentos de esgoto é muitas vezes incompleta, vários estudos detectaram a presença de antibióticos, como SMX, trimetoprim e macrolídeos, nos constituintes do solo (McArdell et al., 2003; Paxeus, 2004; Lindberg et al., 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Os solos

Os solos analisados apresentam características granulométricas semelhantes. Ambos são classificados como solo franco argilo silteoso, porém suas origens são bem distintas, tanto geograficamente quanto à climatologia das regiões. Segundo a classificação de Köppen, a cidade de Recife apresenta clima tropical, com uma precipitação pluviométrica anual local de 1500 mm, concentrada principalmente no outono e no inverno e temperatura média anual 25 °C (Andrade, 2007). Já a cidade de Macon, de acordo com essa mesma classificação, apresenta clima temperado, com uma precipitação pluviométrica anual local de 883 mm, com temperatura média do ar, nos três meses mais frios, compreendidas entre -3°C e 18°C e estações de verão e inverno bem definidas. O solo francês será denominado de Macon devido ao local de coleta, localizado na cidade de Clessé no norte de Macon (Bourgogne, Est de la France, 46°24'59"N, 4°48'54"E), e o solo brasileiro será denominado de Recife, pois foi coletado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil (8° 02'31.14" S, 34°56'36.86"O).

Após a coleta, os solos foram secos ao ar, destorroados e passados em peneira de 2,0 mm e a análise granulométrica foi realizada através do método do densímetro, as frações de argila e silte foram determinadas por sedimentação e a fração de areia por peneiramento. As características granulométricas dos solos estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização granulométrica dos solos estudados.

Solo	Argila (%)	Silte(%)	Areia(%)	Classificação
Macon	31,7	56,5	11,8	Franco argilo silteoso
Recife	28,2	56,3	15,5	Franco argilo silteoso

Fonte: Navel, 2011 e Carmo, 2012

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da caracterização química, em que foram quantificados os valores do potencial hidrogeniônico (pH) e do carbono oxidável dos dois solos (Carmo, 2012 e Navel, 2012).

Tabela 5 – Caracterização química

Solo	pH		CO (g.kg ⁻¹)
	H ₂ O	KCl	
Macon	6,60	5,06	17,5
Recife	7,14	5,63	5,7

pH: potencial hidrogeniônico; CO: Carbono oxidável. Fonte: Navel, 2011 e Carmo, 2012

Pela diferença entre o pH em KCl e em água (Tabela 5), verificou-se que a carga líquida em todas as amostras era negativa, condizente com a mineralogia dos solos Recife e Macon, visto que a maioria dos minerais encontrados nessas amostras é do tipo 2:1 expansivo, como a esmectita e a vermiculita. Em relação ao carbono oxidável total, o solo Macon evidenciou os maiores teores, em razão da deposição e decomposição de resíduos orgânicos existentes na área de coleta.

4.2 O Antibiótico

A solução estoque de SMX foi preparada a partir da pesagem de 2,53 g de sulfametoxazol sólido, com 99,8% de pureza, obtido da Sigma Aldrich, em uma balança de precisão, sendo em seguida diluído em 100 ml de etanol, obtendo-se uma solução final de 25,328 g.L⁻¹. As soluções nas concentrações iniciais desejadas para cada experimento foram preparadas a partir dessa solução estoque.

4.3 Análise química do SMX

As análises foram realizadas no laboratório de cromatografia instrumental do departamento de engenharia química da Universidade Federal de Pernambuco. Foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo modelo SD200 e um detector UV modelo UV-1 Rainin, ambos de fabricação Dynamax/Varian. As condições cromatográficas foram: coluna Fenomenex GEMIN C18, com 150 mm de comprimento, 2 mm de diâmetro e 5 µm de espessura do filme de fase estacionária. A fase móvel foi composta de 60% de água e 20% de metanol e 20% de acetonitrila, sendo o pH ajustado para 3 com ácido fórmico. A detecção foi por absorção ultravioleta, com comprimento de onda de 267 nm, numa taxa

de fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e cada amostra foi analisada em duplicata.

4.4 Os ensaios de sorção

4.4.1 Cinética de sorção

A cinética de sorção foi realizada com uma concentração de 10^{-4} M de SMX. A relação solo: solução foi de 1:10 (5 g de solo para 50 mL de solução de SMX). Os recipientes foram colocados em mesa agitadora e nos intervalos de tempo de 0, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1h, 3h, 5h, 7h, 9h, 12h, 24h e 48h foram coletadas alíquotas de 1 mL. Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado, em duplicata, com filtro de PVDF de 0,45 µm, cuja interação com o SMX foi verificada com padrões, e a concentração de sulfametoxazol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas condições descritas em 4.3. Para verificar que o SMX não é sorvido no filtro PVDF foi preparada uma solução padrão de concentração conhecida e após ser filtrado foi analisado por cromatografia. Observou-se uma mesma área no cromatograma que as soluções não filtradas.

4.4.2 Sorção em função do pH

Visto que o SMX é ionizável, foi avaliado o efeito do pH do solo sobre os mecanismos de sorção do SMX. Desta forma, agitou-se, durante 48 horas, 5,0 g de solo em 50 mL da solução de SMX (10^{-4} M). Após este período as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante filtrado e quantificado por CLAE utilizando as mesmas condições já descritas para a cinética de sorção. O pH foi ajustado antes e após o período de agitação, para aproximadamente os valores de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 12, com uma solução de HNO₃ ou NaOH e o volume final de 50 mL.

4.4.3 Isoterma de sorção

A razão solo:solução (como descrito no item anterior) continha uma solução contendo SMX nas seguintes concentrações (C_0) $5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$ e 10^{-3} M, preparadas em duplicata. As amostras foram agitadas a 200 rpm em mesa agitadora, por 48h e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante filtrado e analisado por CLAE, utilizando as mesmas condições da cinética de sorção. Assim, obtiveram-se as concentrações de SMX sorvidas ao solo (S), utilizando-se a expressão:

$$S = (C_0 - C_e)FD \quad (4.1)$$

C_0 é a concentração de SMX da solução colocada em contato com o solo; C_e é a concentração de SMX na solução após o equilíbrio e FD é o fator de diluição, considerando-se a relação solução:solo (no caso, $FD = 50:5 = 10$).

4.4.4 Modelagem da sorção

O processo de sorção pode ser definido como a partição de uma substância química entre as fases líquida e sólida do solo. Em concentrações no meio ambiente, a isoterma de adsorção de poluentes orgânicos no solo pode frequentemente ser considerada linear. Neste caso, as isotermas de sorção podem ser representadas por:

$$S = K_D C_e \quad (3.4)$$

Sendo S a concentração do soluto na fase sólida, C_e a concentração de SMX na solução após o equilíbrio e K_D é o coeficiente de partição solo-solução.

Como a maior fase solvente em solos naturais para substâncias orgânicas é a matéria orgânica, um parâmetro mais global usado para descrever a capacidade de

sorção dos solos é o K_{OC} , ou seja, o coeficiente de partição do contaminante no carbono orgânico do solo, calculada como:

$$K_{OC} = \frac{K_D}{CO\%} \quad (3.5)$$

Sendo $CO\%$ o conteúdo de carbono orgânico total do solo.

A cinética de sorção pode ser representada matematicamente usando o seguinte modelo de primeira ordem (Yaneva & Koumanova, 2006):

$$\frac{dS_t}{dt} = k_1 (S_{e1} - S_t) \quad (3.6)$$

Sendo S_{e1} e S_t as capacidades de sorção em equilíbrio (cinética de primeira ordem) e no tempo t respectivamente e k_1 a taxa constante de sorção de primeira ordem. Após integração e aplicando-se os limites $t = 0$ a $t = t$ e $S_t = 0$ a $S_t = S_t$, a forma integrada da equação (3.6) torna-se:

$$\log(S_{e1} - S_t) = \log S_{e1} - \frac{k_1}{2,303} t \quad (3.7)$$

k_1 é obtida por meio da regressão linear entre $\log(S_{e1} - S_t)$ e t .

A taxa de sorção para um mecanismo de segunda ordem pode ser descrita por (Yaneva & Koumanova, 2006):

$$\frac{dS_t}{dt} = k_2 (S_{e2} - S_t)^2 \quad (3.8)$$

Sendo S_{e2} e S_t as capacidades de sorção em equilíbrio (cinética de segunda ordem) e no tempo t , respectivamente e k_2 a taxa constante de sorção de segunda ordem. Após integração e aplicando-se os limites $t = 0$ a $t = t$ e $S_t = 0$ a $S_t = S_t$, a forma integrada da equação (3.8) torna-se:

$$\frac{1}{S_{e2} - S_t} = \frac{1}{S_{e2}} + k_2 t \quad (3.9)$$

A equação (3.9) pode ser rearranjada numa forma linear, como:

$$\frac{t}{S_t} = \frac{1}{k_s} + \frac{1}{S_{e2}} t \text{ com } k_s = k_2 S_{e2}^2 \quad (3.10)$$

k_s pode ser considerado como a taxa inicial de sorção quando $S_t/t \rightarrow 0$.

A taxa de difusão intra-partícula pode ser definida como $S_t = k_i t^{0,5}$ (Yaneva & Koumanova, 2006), sendo k_i a taxa constante de difusão intra-partícula.

4.5 Os Ensaio de biodegradação

Como o solo foi conservado com uma baixa umidade, foi preciso reativar os microrganismos presentes no solo adicionando água ao solo, no intervalo de três dias, durante um mês, para manter uma umidade favorável ao desenvolvimento dos microrganismos do solo. Antes de iniciar o experimento, o teor de umidade foi

verificado para manter condições semelhantes nas diferentes amostras. A umidade foi da ordem de 20%. Foram adicionados a 50 g de solo 200 mL de solução de SMX. Para contaminação das amostras de solo foram utilizadas soluções de SMX diluídas a 10^{-5} e 10^{-4} M e assim estudar a resistência bacteriana a duas diferentes concentrações do poluente. O branco foi realizado apenas com uma solução de SMX estéril para observar se existe degradação abiótica. Os solos Macon e Recife foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos para a testemunha. Os solos foram mantidos sob agitação a 250 rpm durante todo o período estudado. Nas amostras dessas suspensões foram realizadas análises química e microbiológica nos intervalos de 0 hora e 1, 2, 7, 15, 22, 28, 58 e 90 dias. Nesses intervalos de tempo pré-determinados foram coletados amostras para análise química (ver 4.3) e para análise microbiológica (ver 4.5.1).

4.5.1 Crescimento microbiano

Cada tubo, das amostras coletadas, serviu de solução mãe e foi diluído serialmente em soro fisiológico a 9,0 g/L de NaCl. 100 μL de cada diluição foi inoculada por espalhamento (Spread-Plate) para placas de petri contendo os meios de cultura LB, YG para a contagem das colônias. O meio de cultura LB não contém agente seletivo e foi utilizado para estudar a flora total cultivável do solo. O meio LB [SMX] (adicionado SMX nas concentrações de 10^{-3} e 10^{-4} M) para estudar os microrganismos resistentes ao antibiótico. Também foram isolados microrganismos no meio de cultura mineral YG [SMX] 10^{-3} . Estes microrganismos são possivelmente degradadores do SMX porque a única fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos é o antibiótico na concentração de 10^{-3} M. A testemunha de manipulação foi realizada com 100 μL de soro fisiológico.

4.7 Isolamento e identificação de uma bactéria degradadora do SMX, burkholdeira sp.

Foram misturadas 50 g de cada solo em 200 ml de uma solução de SMX a 10^{-3} e 10^{-5} M. Em paralelo, o mesmo protocolo experimental foi realizado com alíquotas de solo estéril, e as testemunhas foram também analisadas. Cada condição experimental foi

realizada em duplicata. Os diferentes microrganismos foram incubados no escuro a 20°C durante 30 dias e as amostras foram coletadas no primeiro e no décimo quinto dia.

4.9 Isolamento das bactérias heterotróficas totais e resistentes ao SMX

Uma amostra de 5 g de cada solo não incubado (T0) e incubado durante 30 dias a 0,1 mM de SMX (T30) foi suspensa em 50 mL de uma solução estéril a 0,8% de NaCl. A suspensão foi colocada num misturador (moinho elétrico) e esmagado por 2 x 30 seg. Após 2 minutos de sedimentação, uma alíquota da suspensão de solo foi removida e diluída em série. Um volume de 100 mL de cada diluição foi espalhado sobre o meio ágar YG constituído de extrato de levedura a 1 g/L, de K_2HPO_4 a 0,3 g/L, KH_2PO_4 a 0,2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,2 g/L e glucose a 1 g/L, suplementados ou não com 250 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de SMX. As unidades formadoras de colônias (UFC) observadas após uma semana de incubação a 30°C no escuro foram inoculadas em 2 mL de meio YG líquido. Após agitação a 225 rpm e 30°C durante 24 h, foram inoculadas por faixas de exaustão em meio Agar YG acrescido ou não a 250 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de SMX. Este passo foi realizado pelo menos três vezes para garantir a pureza dos isolados.

As diferenças significativas entre o efeito do SMX e número total de bactérias resistentes entre os solos foram determinadas pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

4.10 Teste de biodegradabilidade SMX

Duas cepas resistentes isoladas de solo Recife foram selecionadas por sua capacidade de degradar o SMX. O procedimento seguido foi descrito por Larcher et al, (2011). Estas estirpes ambientais e uma estirpe padrão de *E. Coli* DH5 α foram independentemente pré-inoculadas em 100 mL de meio mínimo contendo 6 $mg \cdot L^{-1}$ de SMX e 0,5 g/L de glicose. O meio mínimo utilizado é composto de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ a 0,018 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,013 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 0,013 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,25 g/L, Na_2HPO_4 a 7,5 g/L, KH_2PO_4 a 5 g/L, NH_4NO_3 a 5 g/L, extrato de levedura a 0,6 g/L. Após 24 horas de crescimento, de um número equivalente de células de cada cultura bacteriana é pré-colocado em 350 mL de meio mínimo suplementado em SMX (6 $mg \cdot L^{-1}$) e glicose (0,5 g/L). Cada cultura foi realizada em duplicata e os controles com

uma biomassa estéril (inoculação com uma pré-cultura autoclavada) e abióticos (sem biomassa) foram preparados para determinar a quantidade de SMX adsorvido em células bacterianas e perdas abióticas. As diferentes amostras são incubadas no escuro a 30 °C e agitados a 150 rpm. O crescimento bacteriano (DO 600 nm) e a concentração de SMX (CLAE) foram medidos após o primeiro e o sétimo dia de incubação.

4.11 Extração do DNA genômico das estirpes resistentes SMX e amplificação por PCR do gene de rRNA 16S de estirpes resistentes SMX.

O DNA genômico de cada uma das estirpes de bactérias resistentes ao SMX foi extraído utilizando o método descrito por Loncle et al., 1993. Foi extraído por lise química (lisozima + SDS), seguido por tratamento com fenol/clorofórmio.

A amplificação por PCR é realizada com o par de iniciadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGMTACCTTGTTACGACTT). Ocorre a ampliação quase a totalidade do DNAr 16S ou dos fragmentos de cerca de 1600 pb. O meio de reação (50 µL) é composto de: 26,5 µL de água; 10 µL de tampão de PCR GreenGoTaq® Flexi (Promega) 5X concentrado; 4 µL de MgCl₂ a 25 mM; 4 µL de dNTPs a 2,5 mM; 1 µL de cada iniciador de 10 µM; 1,25 µL de BSA a 10 mg.mL⁻¹ e 0,25 µL de GoTaq® FlexiDNA Polimerase a 5 U.µL⁻¹. Este meio de reação, suplementado com 2µL de DNA genômico, foi colocado num termociclador (Biorad) e submetido a uma desnaturação inicial de 10 minutos a 94 °C, seguido por 29 ciclos de amplificação, cada um consistindo na desnaturação por 1 min a 94 °C, uma hibridação de 1 min a 55 °C e um alongamento de 2 min a 72 °C. O programa finaliza com um alongamento final de 10 min a 72 °C. O tamanho das bandas obtidas foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1%. A quantidade de DNA foi estimada por fluorometria (Qubit, Invitrogen).

4.11.1 Análise dos fragmentos de restrição do DNA ribossômico amplificado

Esta análise permite identificar as sequências de DNAr 16S similar antes de seu sequenciamento. Cerca de 1µg de DNAr16S amplificado é digerido por 10 unidades da enzima de HaeIII (Invitrogen) durante 3 horas a 37 °C. Os perfis de restrição são observados por eletroforese em gel de agarose a 2% durante 2 h a 50V. O tamanho dos

fragmentos de restrição foi avaliado utilizando o software Quantity One (Bio-Rad). A análise estatística do perfil "ARDRA" foi realizada com o software XLSTAT. As semelhanças entre os padrões de restrição foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Estas semelhanças são representadas graficamente na forma de um dendrograma. O algoritmo utilizado para a construção do dendrograma de agrupamento é o método UPGMA.

As sequências com um perfil ARDRA 80% idênticos estão agrupadas em conjunto. Um representante de cada grupo e todas as sequências únicas são enviados para o sequenciamento (Genoscreen, Lille).

4.11.2 Análise bioinformática das sequências de genes que codificam 16S rRNA de estirpes resistentes a SMX.

As sequências obtidas foram comparadas pelo BLASTN com as sequências genéticas RNAr 16S do banco de dados GenBank. As sequências dos três organismos mais próximos foram selecionadas, e algumas sequências de referência de cada um dos principais filos de bactérias. O UCHIME presente no pacote de software MOTHURv1.31.2 (Schloss, 2009) foi usado para procurar por sequências quiméricas. Todas as sequências foram alinhadas com o MUSCLE e uma árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor Joining.

4.11.2.1 Extração de ácido nucleico dos solos

O DNA a partir de diferentes amostras metagenômicas foi extraído utilizando o kitFastDNATM SPIN para solo (MP Biomedicals) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de DNA em cada amostra foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% para comparação com uma gama DNA de timo de vitela (Biorad) e por fluorimetria QuBit (Invitrogen).

4.11.2.2 A amplificação por PCR da região hipervariável V4 de codificação do gene 16S rRNA e fingerprinting molecular (DGGE) dos solos estudados.

A amplificação por PCR anterior a análise DGGE foi efetuado com o par de iniciadores 515F-GC(GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGG

GTWTCTAAT) (Caporaso et al., 2012). Os indicadores permitem amplificar a região hipervariável V4 da DNAr 16S, um fragmento de cerca de 250 pb. Um clamp de GC de 40 pb (CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGG) foi adicionado à extremidade 5'do iniciador 515F para impedir a separação completa dos fragmentos de DNA no DGGE. A fim de comparar vários géis de DGGE entre eles, um marcador de tamanho foi preparado misturando as regiões V4 de 6 partes de estirpes bacterianas: *Acinetobacter sp. XXI-6*; *Cellulomonas sp VI-6*; *Pseudomonas sp I-4*; *Pseudomonas aureofaciens*; *Escherichia coli K12* et *Streptomyces sp VIII-6*. O marcador de tamanho foi colocado em cada gel DGGE.

O meio de reação (25 µL) foi composto de: 13,25 µL de água; 5µl de tampão PCR GreenGoTaq® Flexi (Promega) 5X concentrado; 2 µL MgCl₂ a 25 mM; 2 µL de dNTP 2,5 mM; 0,5 µL de cada indicador a 10 µM; 0,625 µL de BSA a 10 mg.mL⁻¹ e 0,125 µL de GoTaq® Flexi DNA Polimerase a 5U.µL⁻¹. Este meio de reação, adicionado de 1 µL de extrato bruto de DNA metagenômico a 10 ng.µL⁻¹, foi colocado num termociclador (Biorad) e submetido ao seguinte programa: desnaturação inicial de 3 min a 94 °C seguido 29 ciclos de amplificação cada um consistindo de desnaturação durante 45 segundos a 94°C, 1 min de hibridização a 50 °C e um alongamento de 1,5 min a 72°C. O programa finaliza com um alongamento de 10 min a 72°C. O tamanho dos fragmentos amplificados obtidos é verificado por eletroforese em 1% de gel de agarose. A quantidade de DNA é estimada, como anteriormente, por comparação com uma gama de DNA de timo de vitela.

A análise DGGE foi realizada com um sistema de DCode (Bio-Rad). Quantidades iguais de produto de PCR (~ 300 ng) foram carregadas num gel de poliacrilamida a 6% (m/v). Géis de poliacrilamida contendo um gradiente de substância desnaturante, que varia de 40% na superfície do gel até 60% na parte inferior do gel (uma solução 100% de desnaturação contendo formamida a 40% (v/v) e uréia 7M). A separação dos produtos PCR foi realizada durante 16 horas a 60 V, em um banho de TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetato de sódio, 1mM EDTA) mantido a 60 °C. Os géis foram corados com SYBR Gold (Invitrogen), 1/10000 (v/v) durante 30 minutos no escuro, depositados sobre uma placa UV a fim de visualizar os fragmentos de DNA, e fotografados com um sistema GelDoc XR (Bio-Rad).

Cada banda é considerada uma unidade taxonômica operacional. As análises dos perfis das comunidades bacterianas foram realizadas utilizando Quantity One (BioRad).

O ruído dos géis foi tratado pelo algoritmo "rollingball" com um raio de 50 pixels. Após normalização dos géis, foram usadas as bandas com um único pico superior a 2% da intensidade do pico de intensidade máxima. A intensidade em cada pico (P_i) corresponde à superfície relativa em cada perfil ($P_i = n_i/N'$ onde n_i é a área sob o pico de i , e N' é a soma das áreas de todos os picos do mesmo perfil). A intensidade relativa de cada banda foi utilizada para calcular os índices de diversidade de Shannon-Weaver ($H' = -\sum P_i \ln P_i$) e Simpson ($D = 1/[\sum n_i(n_i-1)]/[N(N-1)]$). A riqueza das espécies (S') corresponde ao número total de bandas por perfil, assim o índice de Pielou ($J' = H'/\ln S$) que representa a uniformidade do número de espécies bacterianas em cada amostra também foi calculado.

Uma vez que os dados são distribuídos de maneira não uniforme, a comparação dos índices da diversidade é realizada utilizando um teste não-paramétrico (Mann-Whitney).

As semelhanças entre os padrões das bandas foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Estas semelhanças são representadas graficamente na forma de um dendrograma. O algoritmo utilizado para a construção do dendrograma de agrupamento é o método UPGMA.

As bandas de interesse foram cortadas do gel DGGE, dissolvido em 20 μ L de água ultra pura durante a noite a 4°C, re-amplificada com o mesmo conjunto de iniciadores e sequenciamento (Genoscreen, Lille, França). A análise Bio-informática foi realizada como anteriormente. Também foi realizada uma pesquisa de homologia com as sequências de DNAr 16S completas das cepas bacterianas isoladas e resistentes ao SMX.

4.12 A amplificação por PCR dos genes de resistência ao SMX, sul1, sul2 e sul3

Esta amplificação é realizada para determinar a presença de genes plasmídeo de resistência ao SMX (sul1, sul2 e/ou sul3) nos solos estudados e nas cepas resistentes isoladas. O meio da reação é idêntico ao descrito acima. Os iniciadores utilizados para detectar os genes sul1 e sul2 são Sul1F 5'-GCC TCA AGG ACT TCT CCT TC-3', 5'-CAG Sul1R TCC CCG ATT GCA ATA TC-3', 5'-CTC Sul2F GTT TCG TCC ACA GAC GA-3' e 5'-GAA Sul2R GCG GCC CAG CAA TTC AT-3', a temperatura de hibridação é de 55 °C (Chen et al., 2004). Para Sul3, os iniciadores Sul3F 5'-CAA GAT

TTT GAG TGG AAT CG-3 'e 5'Sul3R CAT CTG CAG GGC TTT CTA TAG GGA ACC-3' são utilizados em uma temperatura de hibridação de 51 °C (Perretene Boerlin, 2003).

4.13 Transporte dos antibióticos no solo

Os ensaios de transporte foram realizados seguindo o protocolo experimental adotado por Carmo et al. (2012). O dispositivo experimental foi composto por colunas de solo em vidro com 5,0 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro interno; uma bomba peristáltica; um coletor de frações; um cromatógrafo iônico para determinação das concentrações de KBr das soluções efluentes de cada coluna; capilares de teflon flexíveis com 2,0 mm de diâmetro interno; e balanças digitais para determinação da massa de solução deslocadora aplicada nas colunas de solo. O acondicionamento do solo na coluna foi feito em camadas de aproximadamente 1 cm levemente compactadas até que atingisse a massa específica aparente encontrada no campo para cada solo.

Após a montagem, as colunas foram saturadas, no sentido ascendente das mesmas, com solução iônica de CaCl_2 na concentração de $5,5 \text{ g L}^{-1}$, próxima à da solução do solo, para que os colóides das amostras de solo não sofressem desestabilização, comprometendo a permeabilidade devido à diminuição da força iônica (Johnson et al., 1996). O volume da solução de CaCl_2 utilizado para saturação das colunas, até a formação de uma fina lâmina de água no topo das mesmas, foi utilizado como volume de poros (V_0). Os ensaios consistiram em deslocar por meio de uma bomba peristáltica conectada à parte superior da coluna, certo volume de líquido V_0 que ocupou o espaço poroso contido em uma coluna de solo, por meio de uma solução contendo o soluto (traçador ou soluto interativo) de concentração C_0 , a uma velocidade aparente média v , tendo os efluentes da solução, coletados na base da coluna, por meio de um coletor de frações.

O soluto tende a se difundir ao mesmo tempo em que se infiltra a velocidades variáveis, através dos poros do solo, originando a formação de uma zona de mistura característica do estado de dispersão do soluto. Monitorou-se a progressão do avanço do soluto, medindo-se a concentração C do efluente no curso do tempo. A evolução da razão C/C_0 em função do número de volumes de poros do efluente coletado (V/V_0) forneceu a curva de eluição do soluto.

Nos ensaios com KBr para determinação dos parâmetros hidrodispersivos (D, R, λ , Pe) e reatividade do SMX, dos dois solos, foram utilizadas as vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 cm³ min⁻¹. Estas vazões correspondem a precipitações médias de 24,5; 55 e 85,5 mm h⁻¹ nas cidades de Recife e Macon. Para cada vazão, foram realizados ensaios em duplicata, nas concentrações 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ M. As amostras do efluente foram coletadas em tubos de vidro para evitar perdas por adsorção. A quantificação do SMX foi conforme descrita no item 4.3

Os valores de concentração relativa (C/C₀) e de seus respectivos valores de número de volume de poros foram submetidos ao software CXTFIT 2.0 (Parker & van Genuchten, 1984) para a resolução numérica do modelo de convecção-dispersão cuja equação diferencial parcial é dada por:

$$R \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{P} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{\partial C}{\partial z} \quad (4.2)$$

em que C é a concentração do soluto, expressa em massa de soluto por volume de solução [ML⁻³]; z é a coordenada espacial [L]; t é o tempo [T]; P é o número de Peclet [1]; e R é o fator de retardo [1].

As condições de contorno para a equação (1) foram:

- Condição inicial:

$$C(z, 0) = 0 \quad (4.3)$$

- Condição de contorno inferior:

$$\frac{\partial C}{\partial z}(\infty, t) = 0 \quad (4.4)$$

- Condição de contorno superior:

$$-\frac{1}{Pe} \frac{\partial C}{\partial z} + C = \begin{cases} C_0 & 0 < t \leq t_0 \\ 0 & t > t_0 \end{cases} \quad (4.5)$$

em que C₀ é concentração do soluto na solução deslocadora (M L⁻³); t é o tempo (T); e t₀ é o tempo de aplicação da solução deslocadora [T].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sorção do SMX

Esta parte do estudo da cinética de sorção do SMX determina o tempo de equilíbrio durante os experimentos em batch. A cinética de sorção do SMX para o solo Macon e para o solo Recife é apresentada na Figura 5. A fase inicial de sorção foi similar em ambos os solos. Observa-se que o equilíbrio entre o SMX em solução e o adsorvido no solo foi alcançado após 8 horas de contato entre o solo e a solução, tendo o Macon adsorvido uma quantidade de SMX da ordem de 90 mg.kg^{-1} , enquanto para o Recife esse valor foi da ordem de 100 mg.kg^{-1} . Os valores da taxa inicial de sorção (modelo de cinética de segunda ordem), k_s , para o SMX foram de 200 e de $120,48 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o solo Macon e para o solo Recife, respectivamente. Os dados para sulfonamidas sugerem que um tempo de contato de 8 h, foi necessário para atingir o equilíbrio. Diva-Figueroa et al. (2010) observaram sorção mais lenta para sulfonamidas (12-48 h).

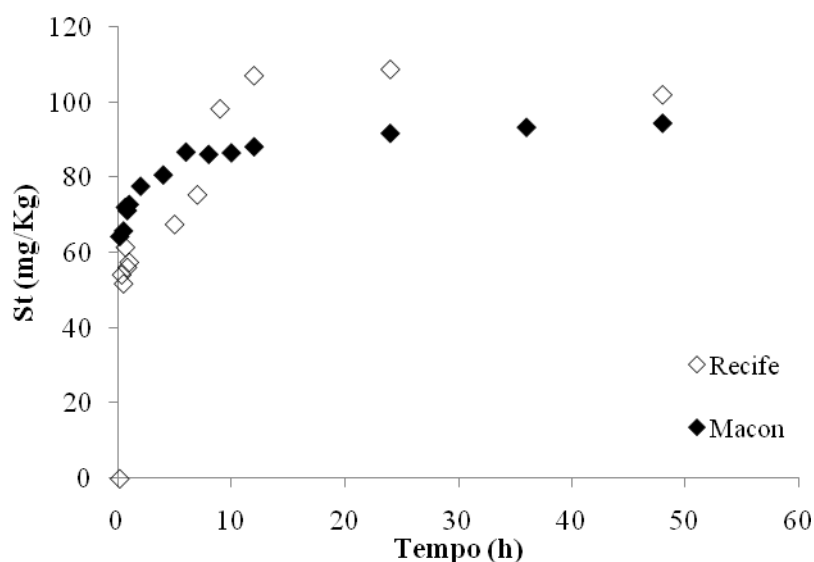


Figura 5 - Cinética de sorção do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.

Os gráficos $\log(Se-St)$ versus t indicam a aplicabilidade do modelo de primeira ordem (Figura 6).

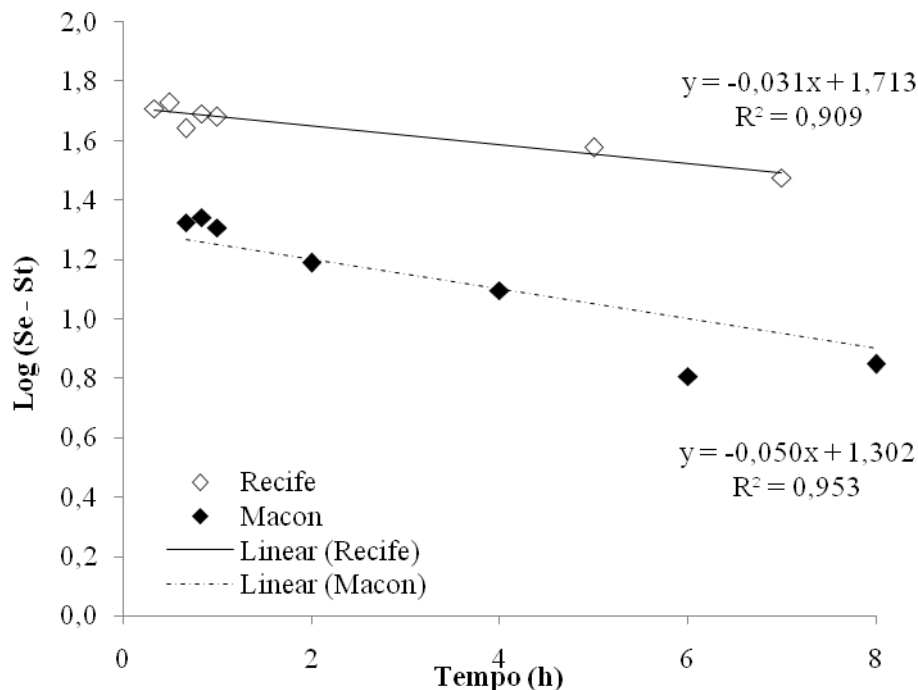


Figura 6 - Cinética de sorção de primeira ordem do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.

Os gráficos lineares de t/S_t versus t indicam a aplicabilidade do modelo de segunda ordem (Figura 7).

O modelo cinético de primeira ordem se mostrou inadequado para descrever a cinética de sorção para o SMX em ambos os solos, como pode ser verificado pelos valores subestimados da capacidade de sorção em equilíbrio, S_{el} . Observando a Tabela 6 verifica-se que resultados satisfatórios para o SMX em ambos os solos foram obtidos com a aplicação do modelo de cinética de segunda ordem.

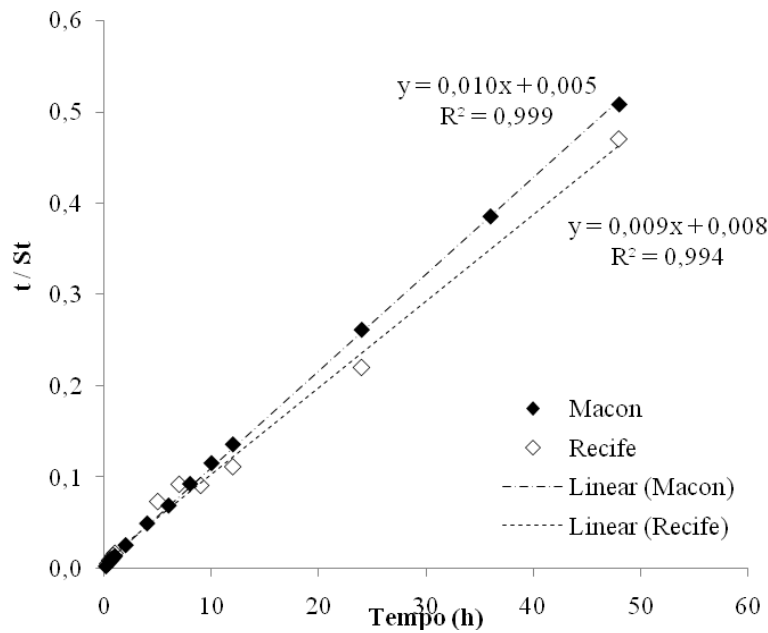


Figura 7 - Cinética de sorção de segunda ordem do sulfametoxazol no solo Macon e no solo Recife.

Tabela 6 - Valores das capacidades de sorção em equilíbrio, Se1 e Se2; das taxas constante de sorção, k1, k2 e ki; e dos coeficientes de determinação, r2, para os três modelos e ambos os solos.

Solos	Capacidade de sorção	Taxa de sorção	Coeficiente de determinação
Cinética de primeira ordem $\frac{dS_t}{dt} = k_1 (S_{e1} - S_t)$			
	S_{e1}	k_1	r^2
	mg.kg ⁻¹	h ⁻¹	—
Macon	20,05	0,115	0,953
Recife	51,75	0,022	0,909
Cinética de segunda ordem $k_s = k_2 S_{e2}^2$			
	S_{e2}	k_2	r^2
	mg.kg ⁻¹	kg.mg ⁻¹ .h ⁻¹	—
Macon	94,33	0,031	0,999
Recife	105,26	0,011	0,994

As isotermas de sorção do SMX segundo o modelo de Freundlich para os solos Recife e Macon podem ser observadas nas Figura 8 e Figura 9. A isoterma de sorção para os solos estudados ocorreu de forma não linear, indicando que o solo Macon teve maior sorção quando comparado com o solo Recife nas mesmas condições.

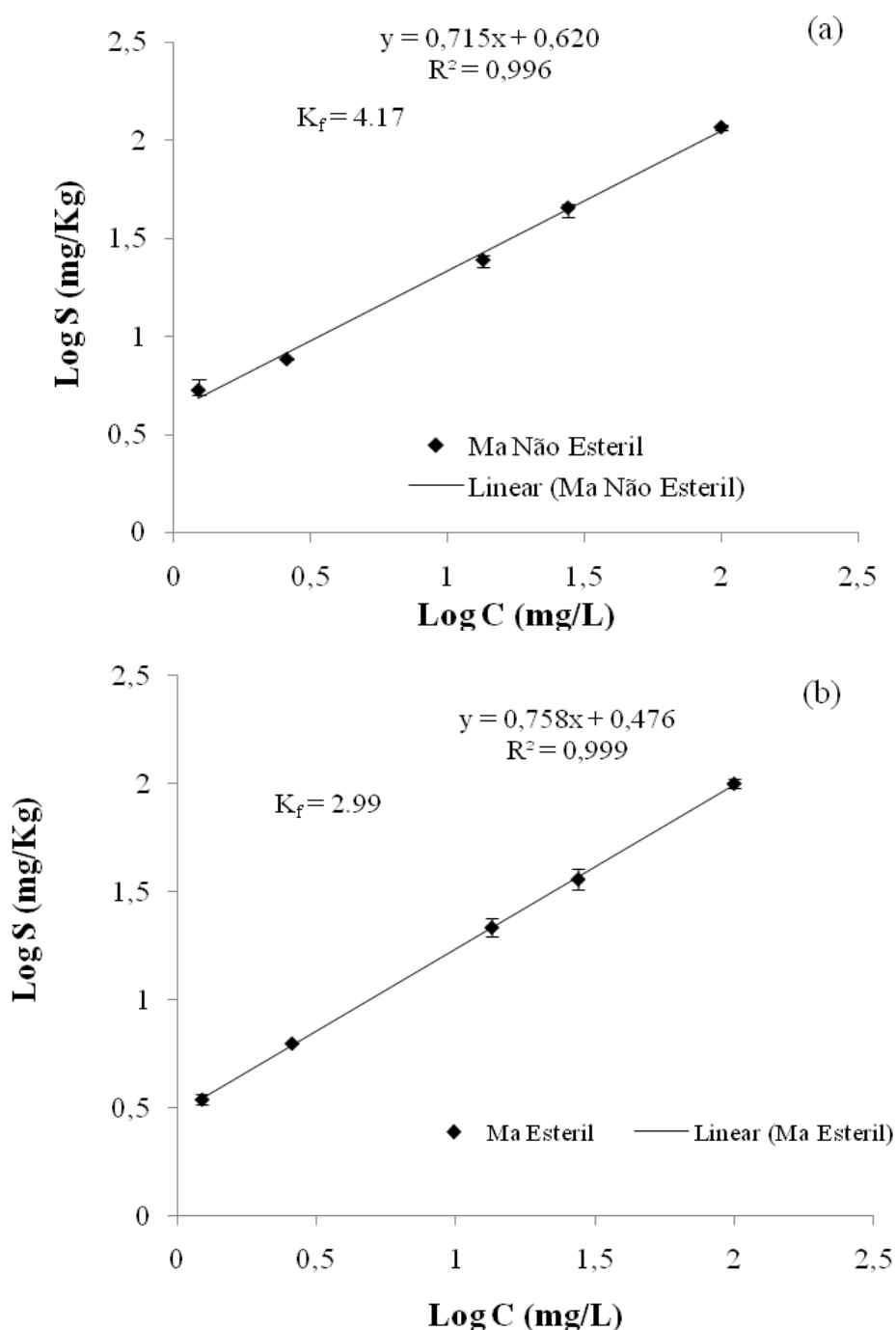


Figura 8 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Macon não estéril (a) e estéril (b).

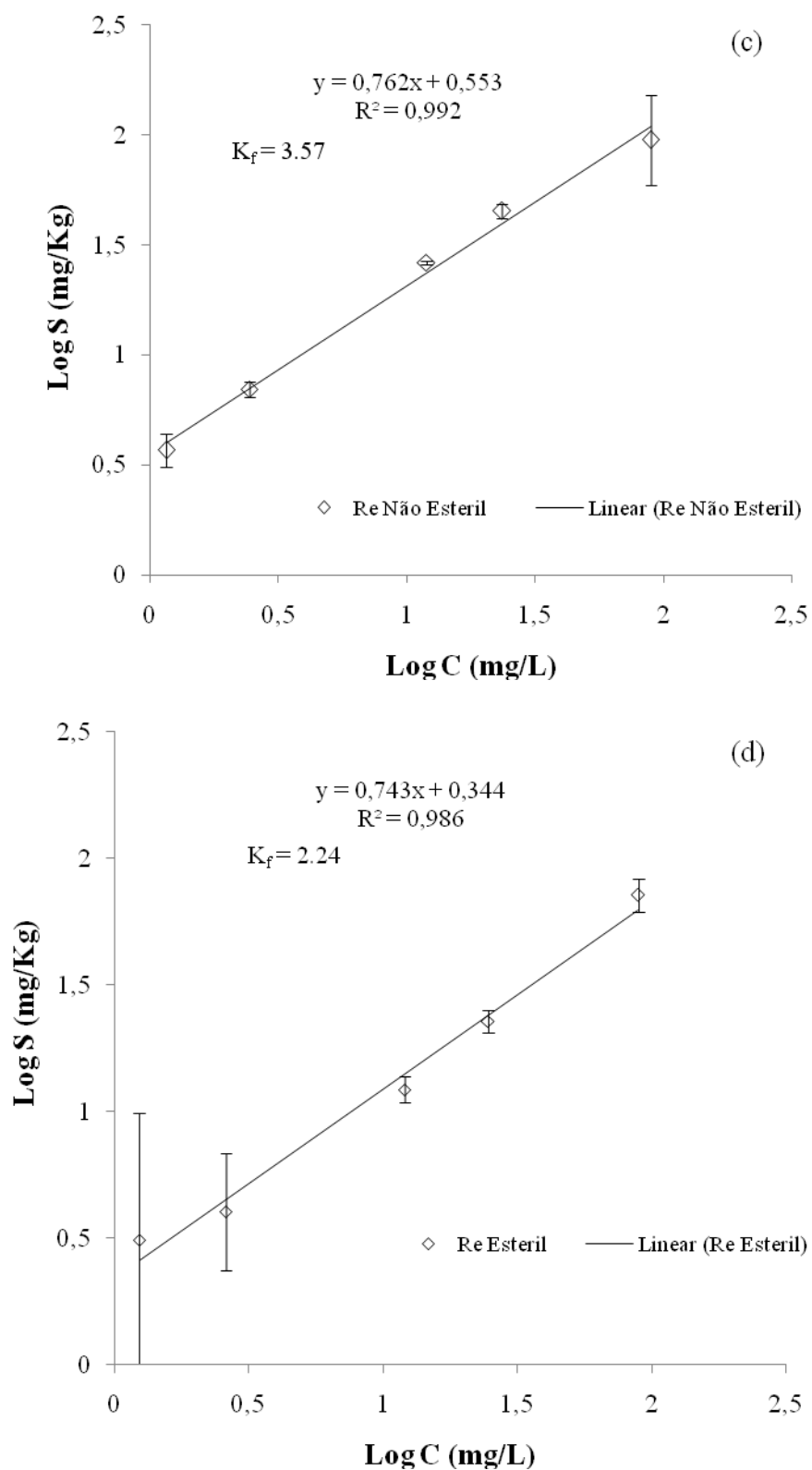


Figura 9 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Recife não esteril (c) e esteril (d).

As isotermas de sorção do SMX segundo o modelo de Langmuir para os solos Recife e Macon podem ser observadas nas Figura 10 e Figura 11.

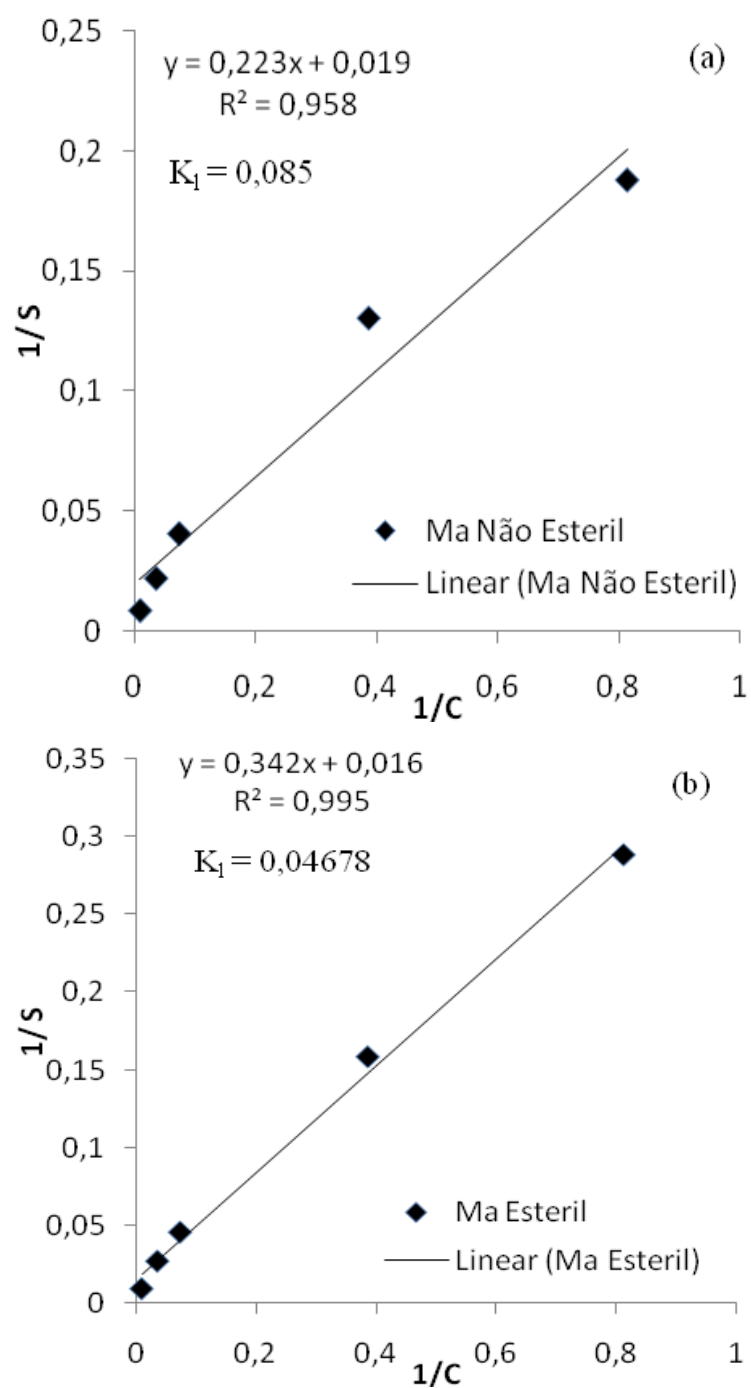


Figura 10 - Isotherma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Macon não estéril (c) e estéril (d).

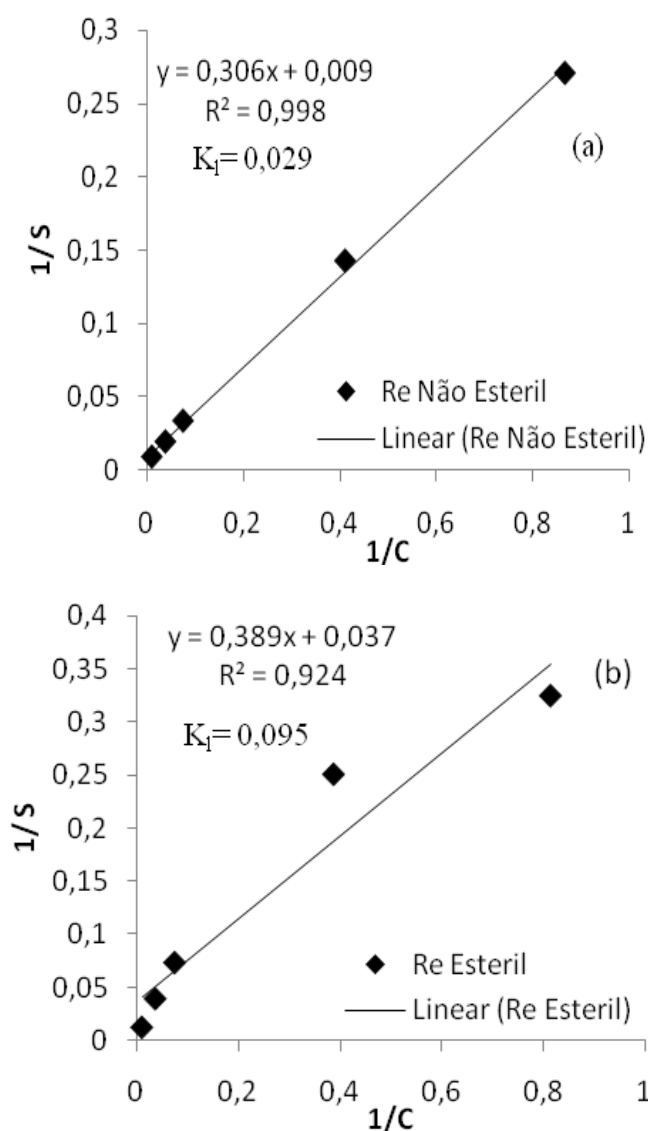


Figura 11 - Isoterma de sorção do sulfametoxazol (SMX) no solo Recife não estéril (c) e estéril (d).

Tabela 7 - Valores dos coeficientes de distribuição linear (K_f) para os solos Macon e Recife em condições estéreis e não estéreis.

Solo	Condição	K_f médio	K_{f1}	K_{f2}	Media dos K_f
Macon	Não estéril	4.17	4.44	3.83	4.14
	Estéril	2.99	3.00	2.98	2.99
Recife	Não estéril	3.57	3.48	3.67	3.59
	Estéril	2.24	0.92	3.50	2.21

Os coeficientes de distribuição linear (K_f), determinados neste estudo, 3.57 e 2.24 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ para o solo Recife não esteril e esteril, respectivamente, e 4.17 e 2.99 para o solo

Macon não esteril e esteril. Observou-se que a maior sorção do SMX ocorreu para o solo Macon quando comparado com o solo Recife (Tabela 7). O valor de K_f para os antibióticos também varia com o tipo de solo. As variações nas quantidades sorvidas não estão necessariamente correlacionadas com o teor de carbono orgânico dos solos, como é observado para a maioria das substâncias orgânicas hidrofóbicas, como os pesticidas e outros poluentes aromáticos (Tolls, 2001; Boxall et al., 2003). Estes valores concordam com o estudo de Srinivasan et al, (2014) onde os valores de K_f variam entre 2,37 e 6,75 e as isotermas são não-lineares.

Srinivasan et al, (2014) estudaram dois solos, o Matawhereo com 2,1% de teor de carbono orgânico e o solo vulcânico (Horotiu) com alto teor de alofana. O solo com alto teor de carbono orgânico possui os menores valores de K_f para sulfametoxazol e sulfachloropyridazine. Estes autores observaram também que a sorção das sulfonamidas diminuíram quando o pH aumentou, presumivelmente, devido ao aumento da proporção da forma aniônica estar presente na solução.

Os modelos de Langmuir e de Freundlich foram capazes de se ajustar aos dados de equilíbrio obtidos experimentalmente, obtendo-se por meio dos ajustes os parâmetros de adsorção. Entre os modelos, o de Freundlich mostrou uma maior aproximação com os dados obtidos experimentalmente.

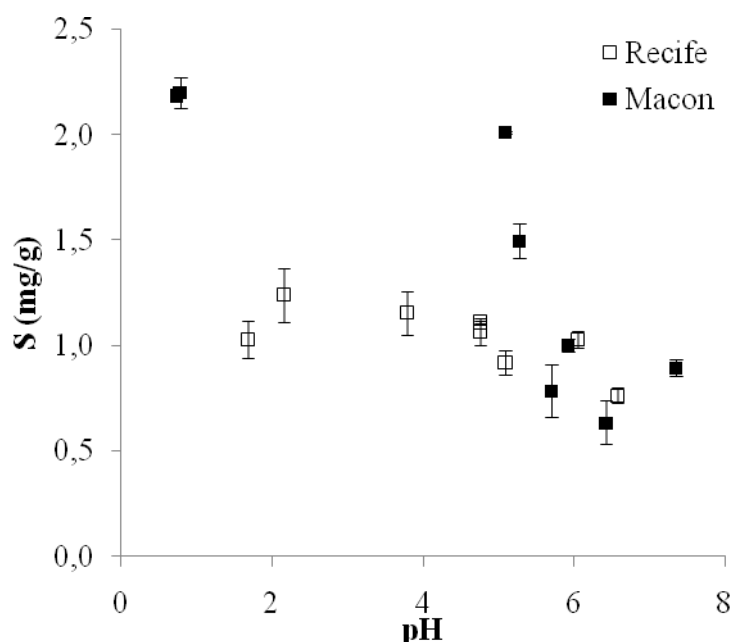


Figura 12 - Sorção do SMX em função do pH.

A sorção variou em função da variação de pH. Para ambos os solos houve alteração na cor do sobrenadante após o tempo de agitação. A molécula do SMX possui dois grupos aminas que são ionizáveis em solução aquosa, assim o sulfametoxazol pode estar presente nas formas positiva, neutra ou negativa. As sulfonamidas apresentam caráter ácido em condições naturais de pH e, portanto, os valores de K_D aumentaram consideravelmente (1 a 30 L.kg⁻¹) com a diminuição nos valores de pH (8 a 4), devido à neutralização de suas moléculas, que são protonadas em valores menores de pH (Thiele-Bruhn, 2003). Por outro lado, em valores maiores de pH ($pK_a + 1$), a maioria das moléculas (> 90 %) encontra-se na forma aniônica, sendo repelida eletrostaticamente pela superfície coloidal dos solos (Kahle & Stamm, 2007). Já os compostos do grupo das sulfonamidas, como a sulfametazina, apresentaram baixa afinidade às partículas do solo ($K_D = 0,2$ a 2 L.kg⁻¹) e, portanto, são considerados móveis no perfil do solo. Isso pode ser ratificado pelas observações de que resíduos de sulfonamidas foram detectados em amostras de águas subterrâneas (Hirsch et al., 1999). O SMX tem um baixo Kow (-0,1 a 1,7; Primor, 2008), e é hidrofílico e polar. Essas propriedades permitem ao SMX ser transportado por longas distâncias sem ser adsorvido por sedimentos (Perez et al, 2005; Lindsey et al, 2001). Além disso, em condições normais de pH ambientais (pH ~ 7-8) o SMX é negativamente carregado (95-100 % Primor, 2008). Essa propriedade pode aumentar a velocidade de transporte em meios porosos, devido à exclusão de ânion.

O SMX possui natureza hidrofílica ($\log K_{ow} < 1$) com dois grupos amina ionizáveis. Como resultado, em uma solução aquosa, o sulfametoxazol pode estar presente nas formas positiva, neutra ou negativa. Se o pH da solução estiver entre os valores de pK_a do composto (pH 1,4 e 5,8), sulfametoxazol está presente predominantemente como uma espécie neutra, enquanto acima do segundo valor de pK_a do composto (pH 5,8), o composto se torna uma espécie carregada negativamente. Essas propriedades físico-químicas indicam que em pH 7,0 o mecanismo de adsorção no solo desempenha um papel insignificante, devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados negativamente do composto com a superfície carregada negativamente do solo.

5.2 Biodegradação

5.2.1 Efeito da concentração do SMX sobre a biodegradação

As Figuras seguintes mostram a degradação do sulfametoxazol nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M.

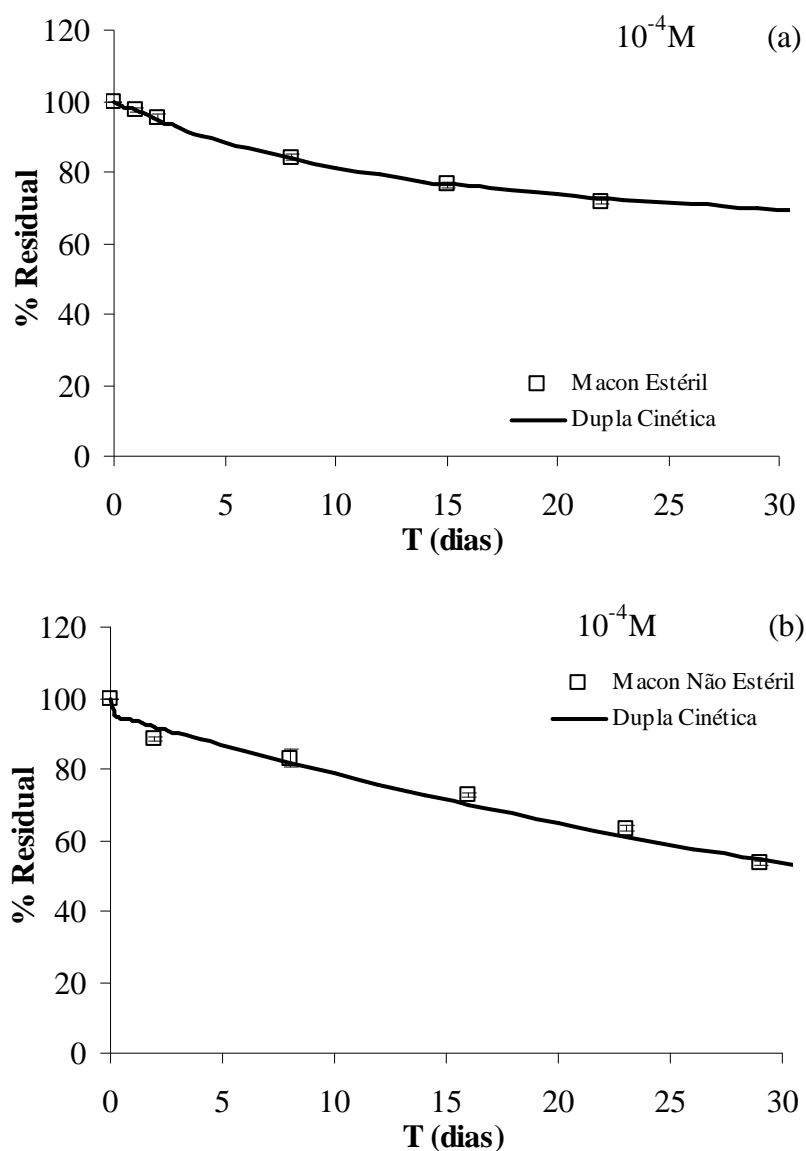


Figura 13 - Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de biodegradação do SMX em solo Macon estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-4} M.

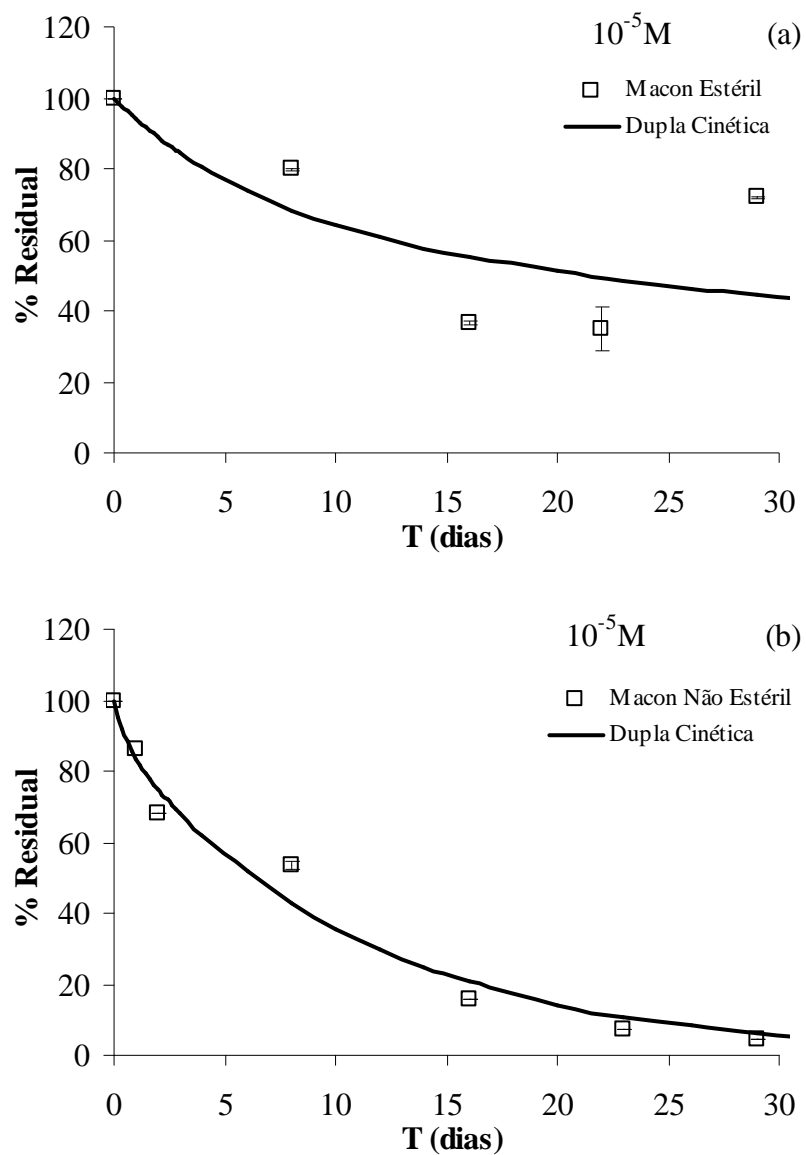


Figura 14 – Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de biodegradação do SMX em solo Macon estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-5} M.

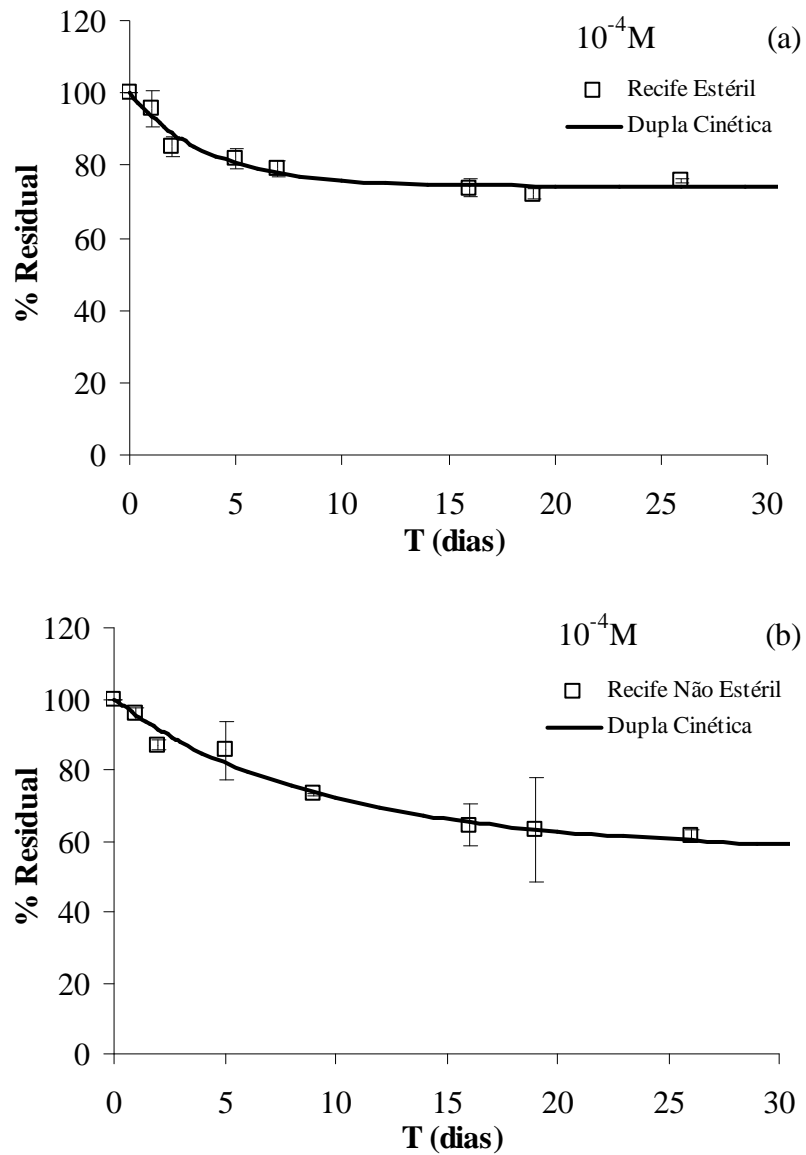


Figura 15 - Modelagem dupla cinética aplicadas aos dados experimentais de biodegradação do SMX em solo Recife estéril (a) e não estéril (b) na concentração 10^{-4} M.

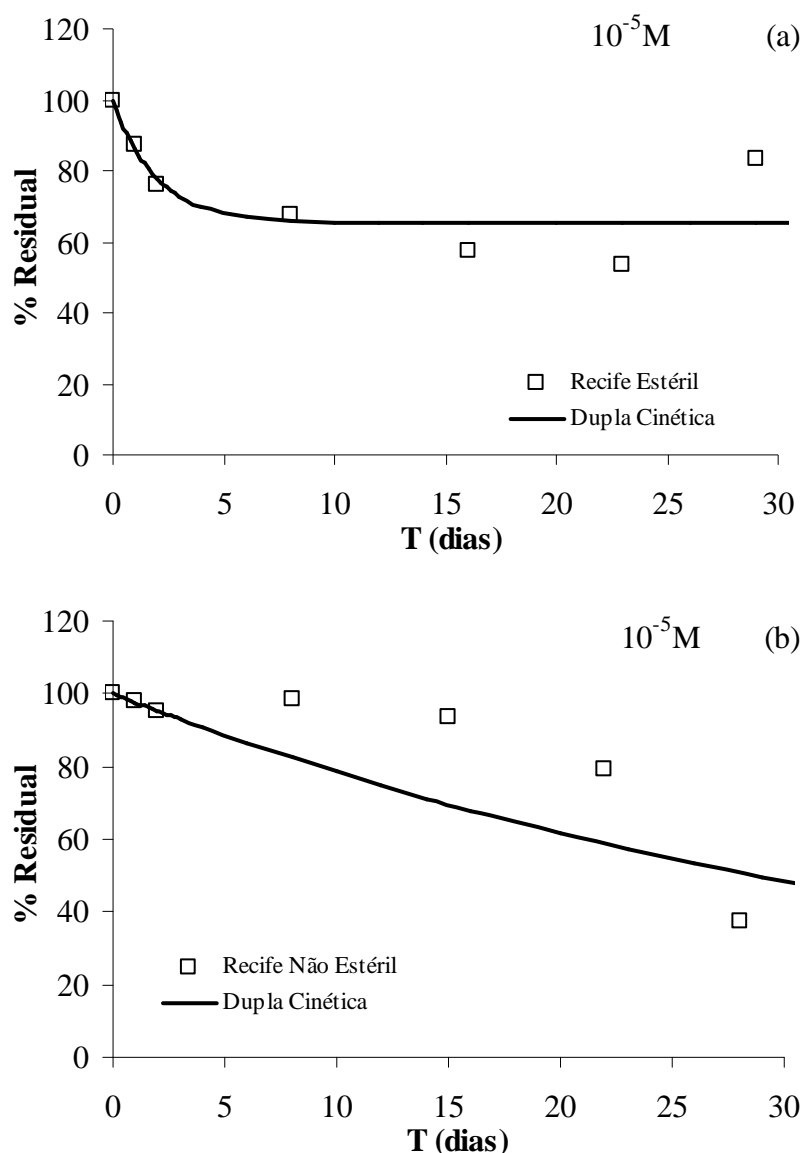


Figura 16 – Modelagem dupla cinética aplicada aos dados experimentais de biodegradação do SMX em solo Recife estéril (a) e não estéril (b) na concentração $10^{-4}M$.

Para a concentração de $10^{-5}M$ em solo não esteril, em 21 dias de estudo observou-se uma queda de 92 e 63% na concentração do SMX para os solos Macon e Recife, respectivamente. Para a concentração de $10^{-4}M$ em solo não esteril, em 30 dias a concentração do SMX era aproximadamente 47 e 42% quando comparada com a concentração inicial para os solos Macon e Recife, respectivamente.

No solo Recife houve uma pequena diferença entre a diminuição da concentração do SMX entre o solo esteril e não esteril para os ensaios realizados na concentração de $10^{-4}M$. A maior degradação do SMX ocorreu para o tempo de 29 dias na concentração

de 10^{-5} M em aproximadamente 92%. Observa-se que ocorreu uma maior degradação do SMX para o solo Macon nas 2 concentrações estudadas, indicando que os microrganismos desse solo estão mais bem adaptados à presença do antibiótico.

A degradação do SMX foi mais lenta nos sistemas estéreis do que os sistemas não estéreis, o que implica que a atividade microbiana está envolvida na degradação do SMX. Por exemplo, no sistema não estéril para o solo Macon 10^{-4} M, o % residual do SMX em 29 d é de 53% para o solo com concentração de 10^{-4} M e 4% em 10^{-5} M, ao mesmo tempo em que era apenas 58 % para a concentração de 10^{-4} M e 37% em 10^{-5} M no sistema não estéril para o solo Recife. Por conseguinte, o % residual de 72% (10^{-4} M) e 34 % (10^{-5} M) no sistema estéril para 23d no solo Macon, ao mesmo tempo que era 75 e 54% no solo Recife. Esta diferença pode ser atribuída à maior densidade de biomassa microbiana no sistema não estéril aumentando a taxa de biodegradação. Lai e Hou, 2008 observaram que além do processo de biodegradação, degradação abiótica (volatilização, hidrólise, adsorção e dessorção) também pode estar envolvido no esgotamento do SMX do sistema de água-sedimento.

A equação de dupla cinética apresentou bons ajustes aos dados experimentais, para os dois solos estudados (Macon e Recife), para a concentração de SMX utilizada (10^{-4} M), conforme se pode averiguar pelo coeficiente de correlação (R) (Tabela 8).

O coeficiente de correlação (R) mostrou que o modelo de primeira ordem não se ajustou bem aos dados experimentais (Tabela 8). Isso se deu, principalmente, porque a biodegradação de sulfametoxazol ocorreu em duas etapas distintas, uma mais rápida e outra mais lenta, tendendo para a estabilização da biodegradação. Isso ocorre, provavelmente, devido à complexidade da molécula.

Autoclavagem nos solos é conhecido pela capacidade de alterar as características físicas, químicas, e propriedades microbiológicas do solo, devido à elevada temperatura e pressão envolvida (Fletcher e Kaufman, 1980; Wolf et al, 1989). Por exemplo, os solos esterelizados por autoclave aumentam as concentrações de carbono orgânico, proporcionando um bom ambiente para os esporos bacterianos que tinha sobrevivido ao tratamento estéril (Tuominen et al., 1994). Uma vez que a autoclavagem mata as bactérias e não os esporos (Nowak e Wronkowska, 1987). É possível que a autoclave realizada neste estudo pode não ter sido suficiente para esterilizar os solos. Outra possível explicação para a perda abiótica do SMX nos solos pode ser atribuído à ligação irreversível com os componentes do solo (Bialk et al., 2005).

Tabela 8 - Parâmetros da modelagem da biodegradação do SMX.

Solo	C (M)	Primeira Ordem		Dupla Cinética			
		Parâmetro	R ²	Parâmetros			R ²
		B		A	B	c	
Macon Estéril	10 ⁻⁴	0.0169	0.9702	0.2624	0.1041	2.40E-03	0.9978
	10 ⁻⁵	0.0278	0.6622	0.3540	0.1548	1.33E-02	0.7515
Recife Estéril	10 ⁻⁴	0.0286	0.8977	0.2592	0.2786	4.24E-12	0.9608
	10 ⁻⁵	0.0066	0,6235	0.348	0.5108	2.57E-12	0.687
Macon Não estéril	10 ⁻⁴	0.0209	0.9839	0.9578	0.0465	8.02E-10	0.9950
	10 ⁻⁵	0.1054	0.977	0.1074	1.6158	9.15E-02	0.984
Recife Não estéril	10 ⁻⁴	0.0223	0.8540	0.3709	0.1254	2.60E-03	0.9818
	10 ⁻⁵	0.0239	0.850	3.6E-15	0.0149	2.43E-02	0.849

5.3 Impacto

5.3.1 Evolução das populações bacterianas

As figuras seguintes mostram o crescimento das bactérias totais cultiváveis presentes no solo Macon (Figura 17) e Recife (Figura 18) em solução de SMX nas concentrações 10⁻³M (Ma[SMX]10⁻³) (a), 10⁻⁴M (Ma[SMX]10⁻⁴) (b) e 10⁻⁵M (Ma[SMX]10⁻⁵) (c) e cultivadas sem a presença da solução com SMX (Ma testemunha) (d).

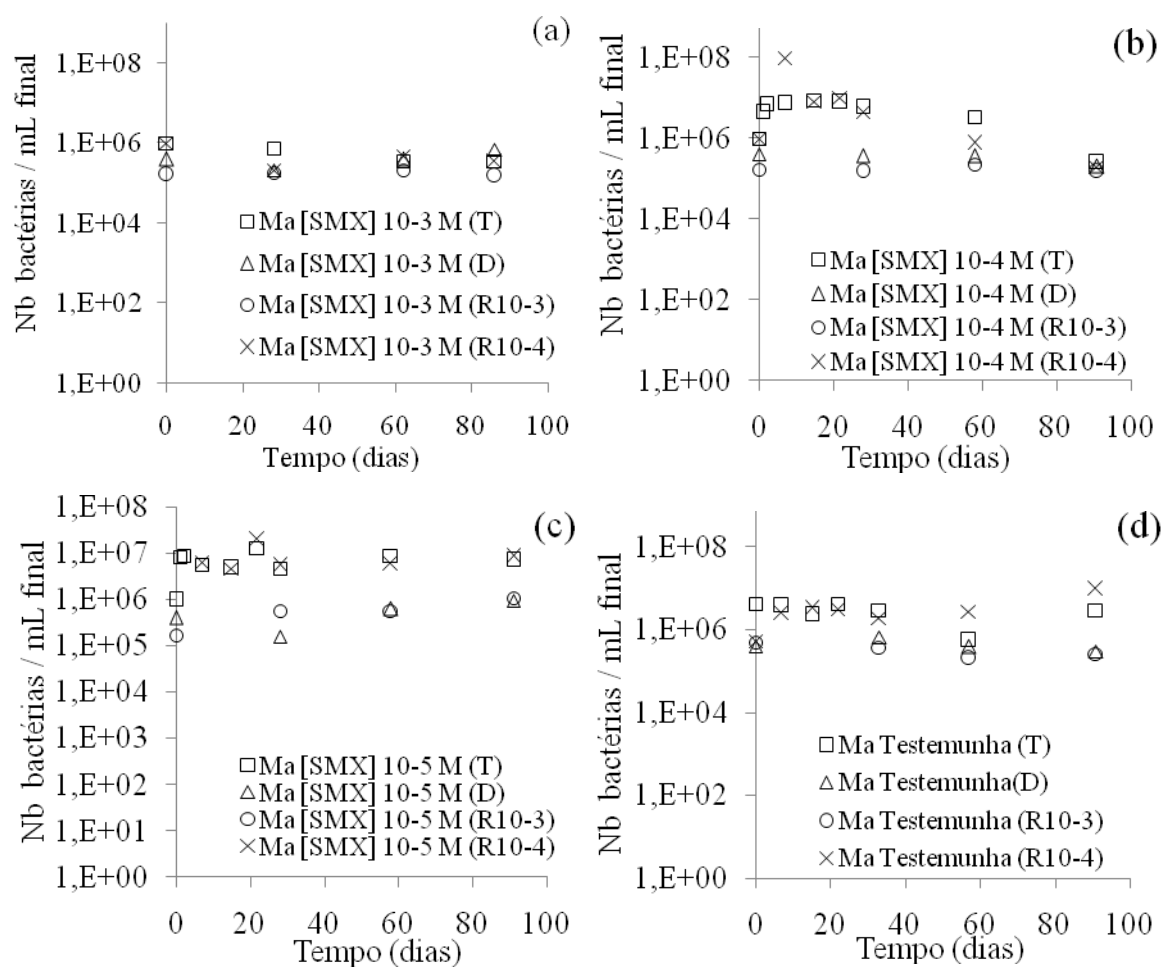


Figura 17 - Crescimento das bactérias totais cultiváveis [T], resistentes [R] e degradadoras [D] do SMX, em placas de petri no solo Macon. Em contato com o solo uma solução de SMX nas concentrações 10-3M (a), 10-4M (b), 10-5M (c) e sem adição de SMX (d)

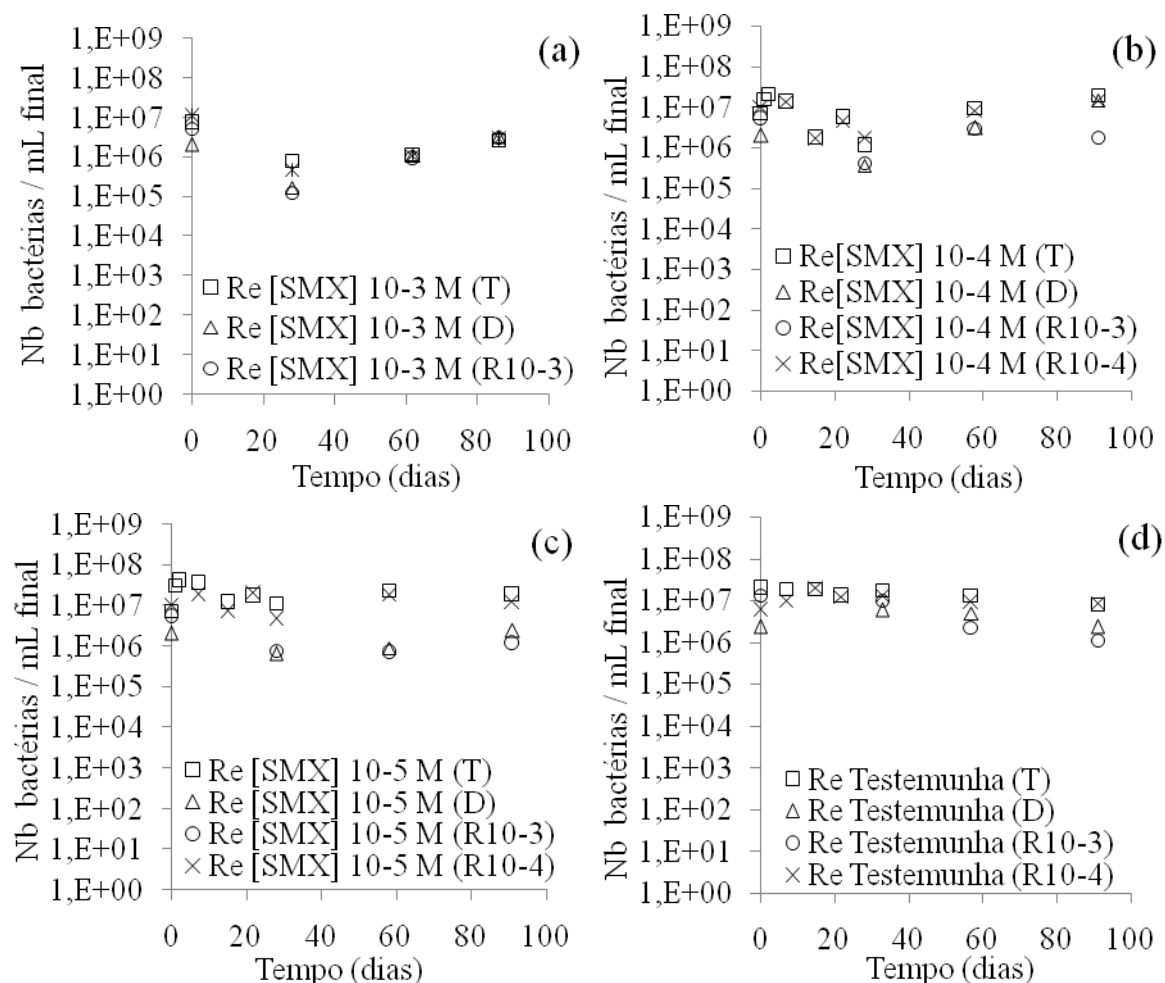


Figura 18 - Crescimento das bactérias totais cultiváveis [T], resistentes [R] e degradadoras [D] do SMX, em placas de petri no solo Recife. Em contato com o solo uma solução de SMX nas concentrações 10-3M (a), 10-4M (b), 10-5M (c) e sem adição de SMX (d)

5.4 Isolamento e identificação

5.4.1 Isolamento das bactérias cultiváveis totais e resistentes ao SMX

Uma enumeração das bactérias totais cultiváveis (UFC) e resistente ao SMX foi realizada para ambos os solos em T0 e após 30 dias de incubação no escuro a 20 °C na presença de SMX a 0,1 mM. Uma vez que a cultura de bactérias depende das características bioquímicas de cada do solo, comparou-se a relação entre o número de bactérias resistentes ao SMX e o número total de bactérias de cada solo (Tabela 9). Inicialmente, a proporção das bactérias resistentes é maior no solo Macon que no solo Recife (P = 0,002). Após 1 mês de incubação na presença de SMX, a proporção de

bactérias resistentes a esse antibiótico aumentou de maneira significativa no solo Macon ($P = 0,03$) (Tabela 9). A proporção de bactérias resistentes também aumenta igualmente no solo Recife, atingindo um nível comparável ao nível do solo Macon.

Tabela 9 – Contagem das bactérias cultiváveis totais e resistentes ao SMX nos solos Macon e Recife antes (T0) e após 30 dias de incubação com 10^{-4} M de SMX (T30)

	Número de bactérias totais (NBT)	Número de bactérias resistentes (NBR)	Razão NBR/NBT
Macon T0	$9,10.10^5 \pm 8,49.10^4$	$1,58.10^5 \pm 1,06.10^4$	$0,17 \pm 0,02$
Macon T30	$6,20.10^5 \pm 1,20.10^5$	$2,11.10^5 \pm 7,07.10^2$	$0,35 \pm 0,08$
Recife T0	$1,97.10^5 \pm 2,83.10^5$	$2,13.10^6 \pm 1,13.10^5$	$0,11 \pm 0,01$
Recife T30	$9,80.10^5 \pm 2,40.10^5$	$2,35.10^5 \pm 9,12.10^4$	$0,25 \pm 0,09$

5.4.2 Atribuição taxonômica e análise filogenética

O DNAr 16S de 30 cepas resistentes ao SMX isoladas a partir de cada solo T0 e T30 (120 sequências de DNAr 16S no total) foram amplificadas por PCR e digeridos com uma enzima de restrição. Os perfis ARDRA obtidos foram analisados e agrupados em cluster. Sendo os perfis ARDRA de cada grupo idênticos a 80%. Assim, uma sequência de DNAr 16S representativa de cada cluster foi sequenciada. Uma atribuição taxonômica foi feita por comparação das sequências obtidas do banco de dados GenBank (NCBI) e uma árvore filogenética também foi construída usando sequências identificadas de referência que pertence à grande filos bacterianos (Figura 19). Apenas 8 sequências diferentes foram identificados para o solo Macon T0. Eles pertencem exclusivamente às bactérias do gênero *Bacillus* (Firmicutes). Após 30 dias de incubação na presença de SMX, de 24 sequências diferentes foram obtidas a partir deste mesmo solo. Eles são membros do gênero *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* e bactérias *Burkholderia* pertencentes a três filos (Actinobactérias, Firmicutes e Proteobacteria). Por outro lado, o solo Recife possui uma maior diversidade de bactérias cultiváveis resistentes ao SMX em T0, com 26 diferentes sequências identificadas contra apenas duas após um mês de incubação na presença do antibiótico. As bactérias isoladas no tempo T0 pertencem ao gênero *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* e pertencem a três filos encontrados no solo de Macon. Aqueles isolados em T30 pertencem ao gênero *Bacillus* e *Burkholderia*.

Entre essas bactérias cultiváveis resistentes ao SMX, nenhuma possui um dos 3 genes plasmídeo de resistência conhecidos ao SMX. Por outro lado, os genes *sul1* e *sul2* foram detectados no DNA extraído dos solos MA e RE antes e após da adição de SMX.

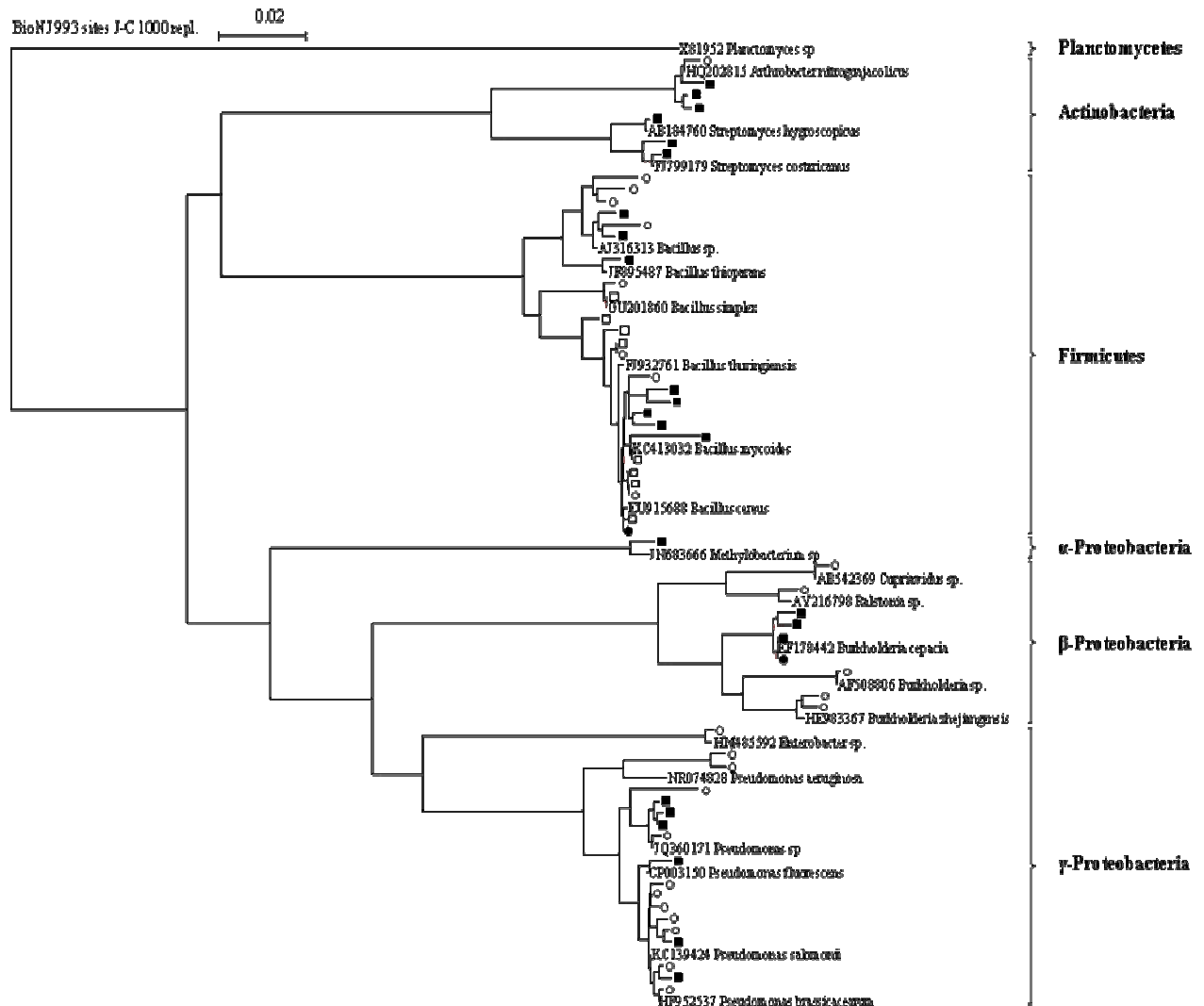


Figura 19 - Árvore filogenética representando a afiliação taxonômica dos 60 isolados resistentes ao SMX do solo Macon (quadrado) e Recife (círculo) 30 dias de incubação com SMX 0,1 mM.

As sequências de DNAr 16S de diversos isolados e as sequências mais semelhantes na base de dados GenBank, foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE. A árvore foi construída usando o método de Neighbor-Joining. Somente valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 80% são indicados.

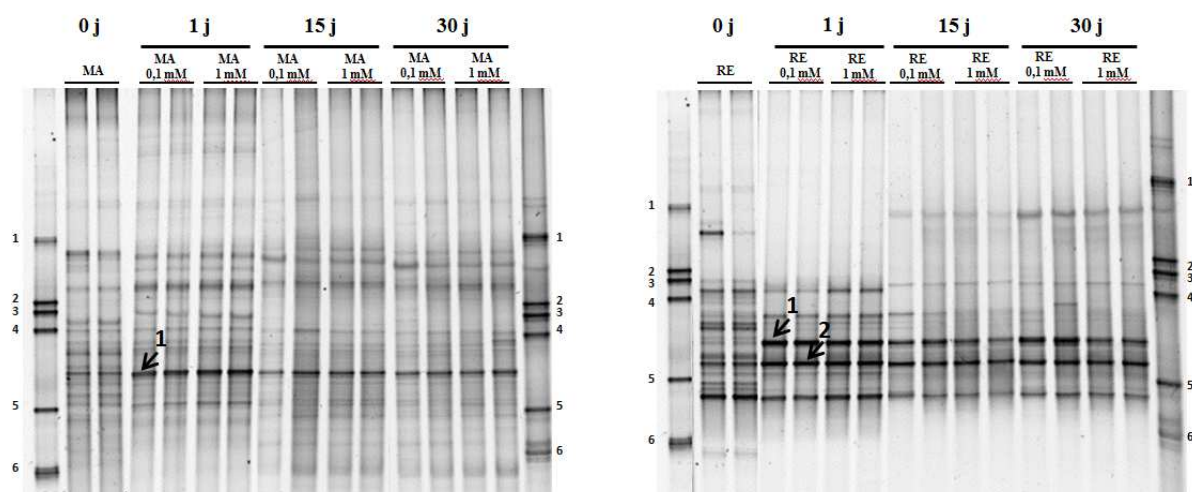


Figura 20 - PCR-DGGE da região hipervariável V4 de RNAr 16S gene codificando comunidades bacterianas do solo temperado (MA) e do solo tropical (RE) com ou sem tratamento com 0,1 e 1 mM de SMX nos tempos de 1, 15 e 30 dias. As bandas indicadas pelas setas 1 e 2

Os pontos "m" correspondem ao marcador de tamanho consistindo de regiões V4 das seguintes cepas bacterianas: 1, *Acinetobacter* sp. XXI-6; 2, *Cellulomonas* sp VI-6; 3, *Pseudomonas* sp I-4; 4, *Pseudomonas aureofaciens*; 5, 6 *Escherichia coli* K12, e *Streptomyces* sp VIII-6

5.4.3 Efeito do SMX sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos

Para avaliar o efeito do SMX sobre todas as comunidades bacterianas dos solos estudados, os rastros moleculares foram feitos a partir da região hipervariável V4 do gene que codifica o RNAr 16S. Estes fragmentos foram amplificados a partir do DNA total extraídos de amostras de solo Macon e Recife incubadas por 1, 15 e 30 dias na presença de 10^{-3} e 10^{-4} M de SMX e discriminados por DGGE (Figura 20). Duas réplicas independente do tratamento e tempo de incubação foram analisadas e duas amostras testemunhas, não tratadas, para cada tipo de solo.

A análise UPGMA mostra uma repartição dos padrões de bandas em dois grupos principais (23% de similaridade), correspondente aos dois tipos de solo e 8 grupos menores (68 a 93% de similaridade), o que corresponde ao tempo inicial e aos 3 tempos de incubação (Figura 21). No entanto, um artefato é observado para uma réplica da amostra de solo Macon tratado com SMX a 0,1 mM durante 16 dias. Os padrões de

bandas mostram cada réplica de similaridade 88 a 98% e para o solo RE e 82 a 97% para o solo MA.

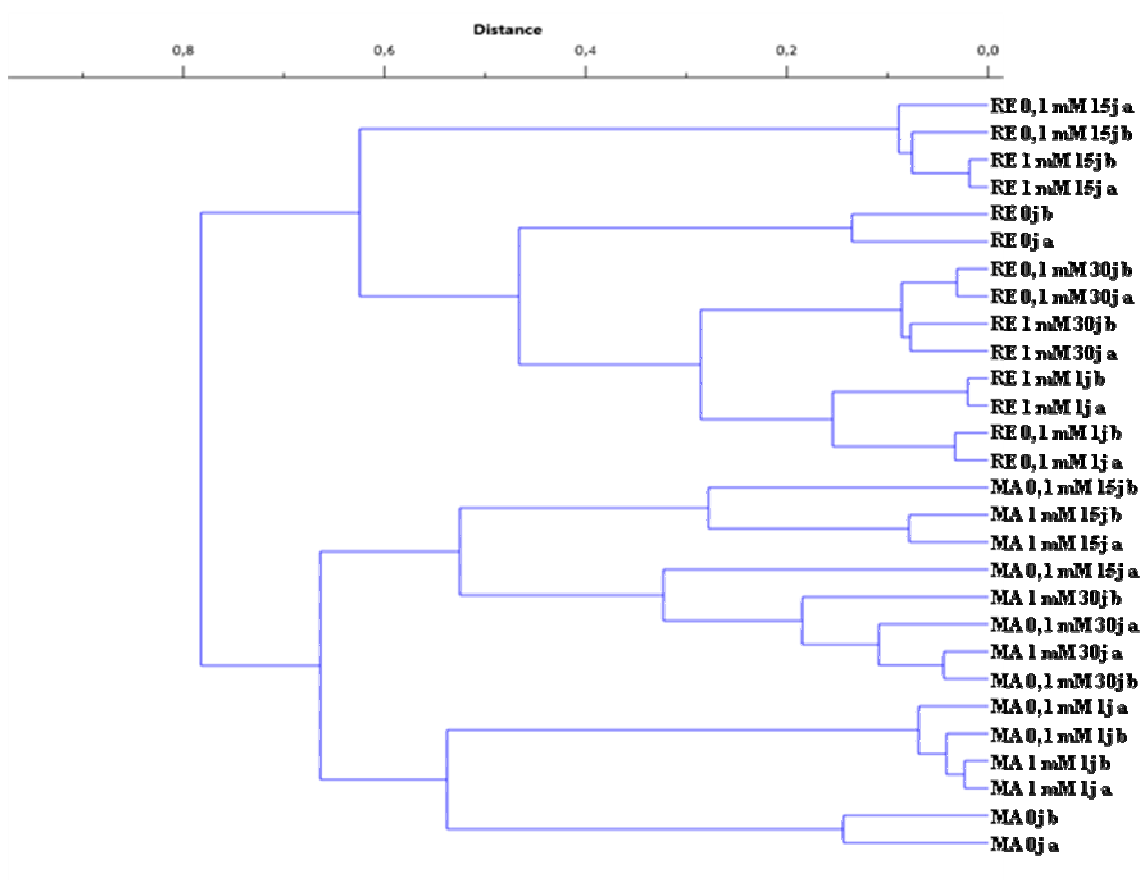


Figura 21– Endograma desenvolvido pelo método UPGMA agrupando os perfis de DGGE mais semelhantes

O cálculo do índice de Shannon (H'), e do índice de Simpson (D) mostram que os solos não tratados Macon e Recife têm uma diversidade equivalente

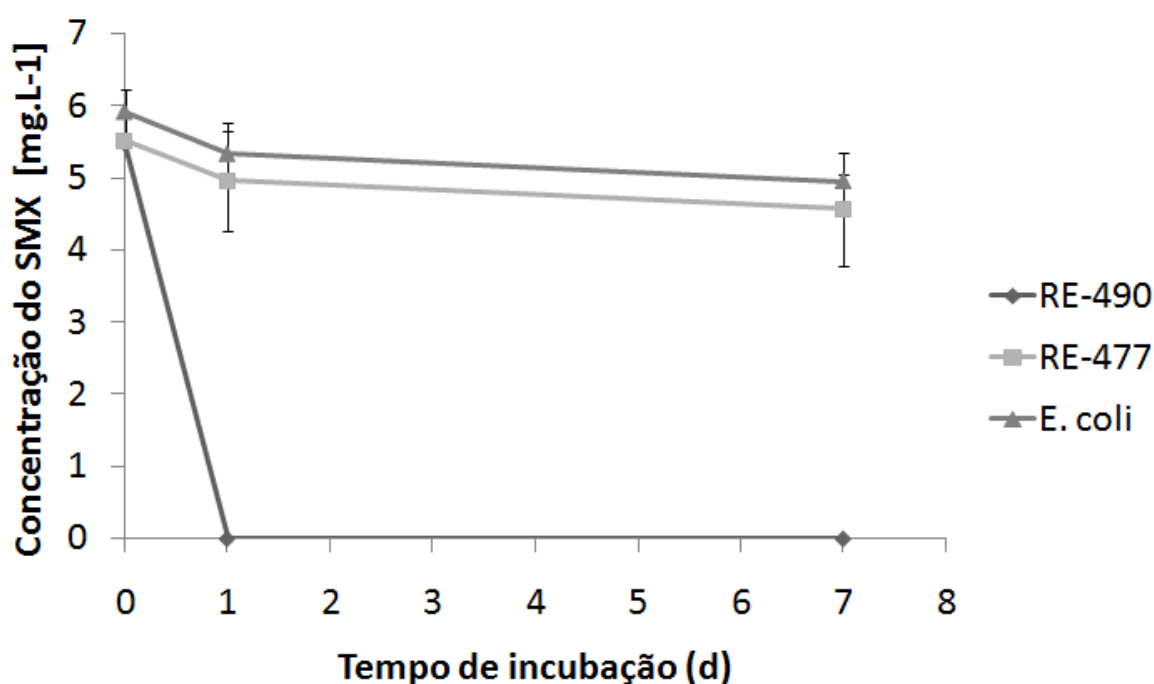


Figura 22 – Biodegradação do SMX pela cepa RE-490, RE-477 et *E.coli* DH5 α . A concentração inicial do SMX de 6 mg/L.

Tabela 10). A adição de 0,1 mM de SMX afeta negativamente e significativamente a diversidade bacteriana do solo Recife para os 3 tempos de incubação testados. Além disso, a presença de 1 mM de SMX no solo Recife provoca uma diminuição significativa da diversidade após 15 dias de incubação. Em relação ao solo Macon, nenhuma diminuição significativa da diversidade bacteriana foi observada independentemente da concentração de SMX adicionado e o tempo de incubação. Foi observada para os dois solos não tratados a diversidade semelhante das bactérias. Isso diminui significativamente para o solo Recife após incubação de 1, 15 e 30 dias, com 10^{-4} M de SMX e após 1 e 15 dias, com 10^{-3} M de SMX. Não foi observada nenhuma diferença na uniformidade entre os solos, assim como para nenhum dos dois tratamentos (antes e depois da adição de SMX).

Algumas bandas desaparecem ou se tornam predominantes no primeiro dia após a adição de 0,1 ou 1 mM SMX. Este fenômeno parece ser mais pronunciado para o solo Recife, especialmente onde duas bandas se tornam maioritárias. Uma destas duas bandas é comum a ambos os tipos de solo. Estes dois perfis observados depois do tratamento com SMX foram cortados, purificados e sequenciados. A análise bioinformática mostra que esta bactéria pertencente ao gênero *Arthrobacter* e

Burkholderia. Além disso, a sequência que representa a banda 2, exclusivamente presente no solo Recife é 100% idêntica à região V4 das estirpes bacterianas isoladas a partir de 16S rDNA tratada QE2 solo: RE-477, e RE -490. Está relacionado a 98% Burkholderia zhejiangensis (HE983367) Burkholderia sp. OP-1 (HM802212) e Burkholderiasp. SFA1 (AB232333), todos descritos como capazes de degradar organofosforados: o metil-paration (Lu et al, de 2012) e fenitothrion (Kikuchi et al, 2012).

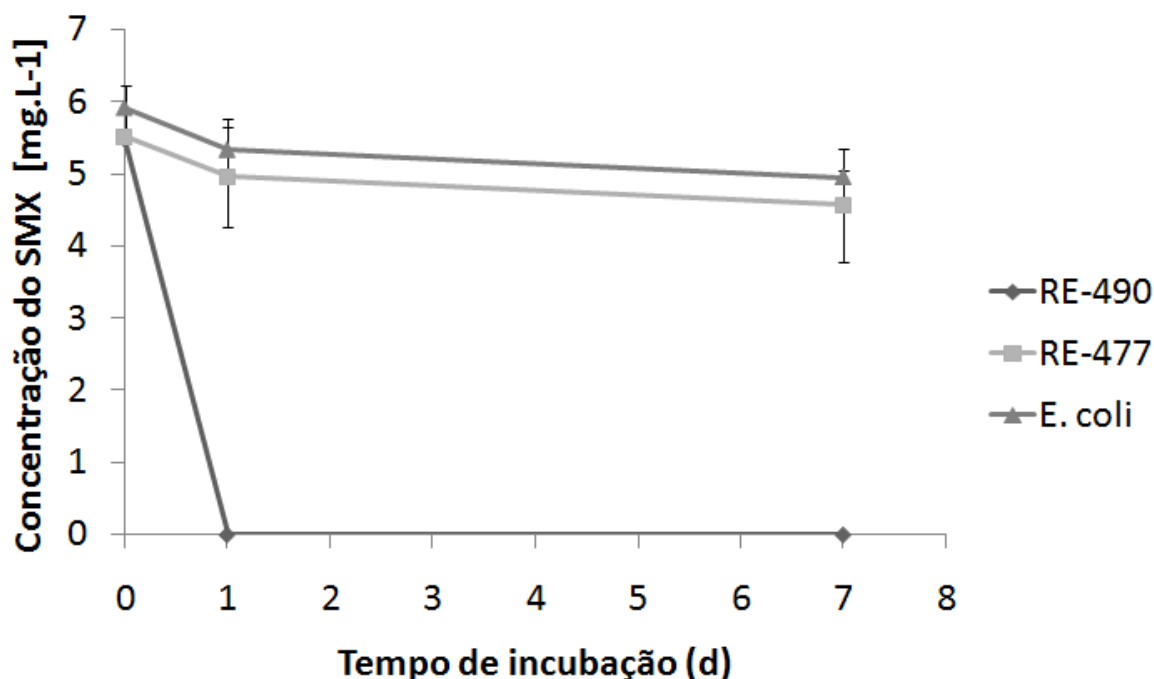


Figura 22 – Biodegradação do SMX pela cepa RE-490, RE-477 et E.coli DH5 α . A concentração inicial do SMX de 6 mg/L.

Tabela 10 – Valores do índice de diversidade, riqueza de espécies e uniformidade de cada amostra de solo analisada. No primeiro (T1), décimo sexto (T16) e vigésimo nono (T29) dias de tratamento.

	H'	D	S	J'
Macon 0j	2,73 \pm 0,04	0,93 \pm 0,01	22 \pm 1,4	0,88
Macon 10⁻⁴ M T1	2,39 \pm 0,19	0,90 \pm 0,01	19	0,81 \pm 0,06
Macon 10⁻⁴ M T16	2,37 \pm 0,19	0,88 \pm 0,03	17 \pm 2,8	0,84 \pm 0,02
Macon 10⁻⁴ M T29	2,39 \pm 0,04	0,88	18 \pm 1,4	0,83 \pm 0,01
Macon 10⁻³ M T1	2,55 \pm 0,18	0,92	22,5 \pm 0,7	0,82 \pm 0,07
Macon 10⁻³ M T16	2,44 \pm 0,18	0,89 \pm 0,02	17 \pm 1,4	0,86 \pm 0,04
Macon 10⁻³ M T29	2,30	0,87	17,5 \pm 0,7	0,80 \pm 0,01

	H'	D	S	J'
Recife T0	2,60 ± 0,03	0,91	20 ± 1,4	0,81 ± 0,01
Recife 10⁻⁴ M T1	1,93 ± 0,05*	0,84 ± 0,01*	10,5 ± 0,7*	0,82 ± 0,05
Recife 10⁻⁴ M T16	1,76 ± 0,04*	0,79 ± 0,01*	9,5 ± 0,7*	0,78 ± 0,01
Recife 10⁻⁴ M T29	1,83 ± 0,04*	0,81 ± 0,01*	10,5 ± 0,7*	0,78 ± 0,01
Recife 10⁻³ M T1	1,99	0,85	10*	0,86
Recife 10⁻³ M T16	1,76 ± 0,08*	0,79 ± 0,01*	8,5 ± 0,7**	0,82 ± 0,01
Recife 10⁻³ M T29	1,97	0,82	12,5 ± 0,7	0,78 ± 0,02

H': Índice de Shannon-Weaver ($H' = -\sum P_i \ln P_i$)

D: índice de Simpson ($D = 1 / [\sum (n_i - 1)] / [N(N-1)]$)

S: A riqueza de espécies

J': índice de Pielou ($J' = H' / \ln S$)

* P < 0,05; ** P < 0,01 pelo teste de Mann-Whitney.

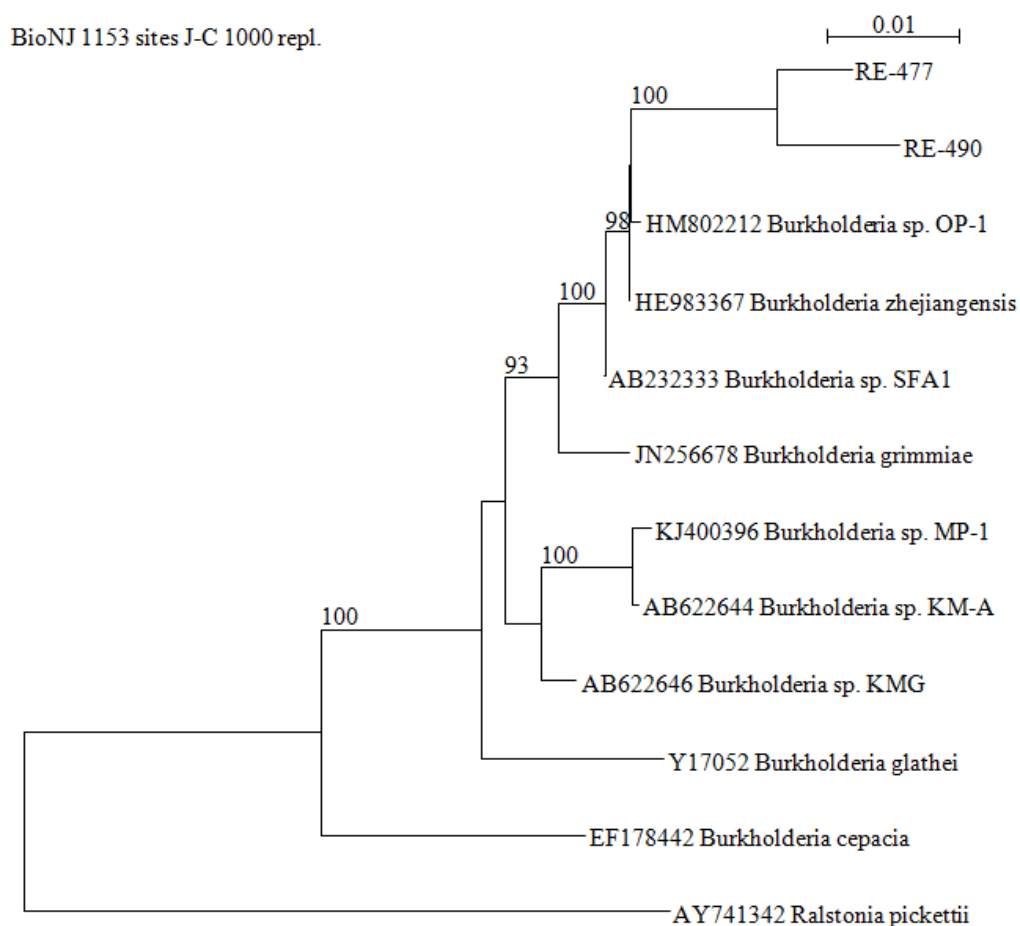


Figura 23 – Árvore filogenética representando a filiação taxonômica dos isolados RE-477 e RE-490.

As sequências de DNAr 16S mais similares da base de dados GenBank foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE. A árvore foi construída seguindo o método Neighbor-Joining. Apenas os valores bootstrap (1000 replicatas) superiores a 80% são indicados.

5.5 Mobilidade do SMX em colunas de solo

5.5.1 Caracterização hidrodispersiva com KBr

Os valores das variáveis determinadas experimentalmente para os ensaios de deslocamento miscível do KBr são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Condições experimentais para os ensaios de deslocamento miscível do KBr nos dois solos nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 cm³ min⁻¹

Solo	ρ_s (g cm ⁻³)	V_p (cm ³)	θ_s (cm ³ cm ⁻³)	Q (cm ³ min ⁻¹)	q (cm h ⁻¹)	T ₀ (h)
Recife	1,37	12,71	0,49	0,2	2,38	1,11
				0,45	5,36	0,49
				0,7	8,33	0,31
Macon	1,34	13,42	0,48	0,2	2,38	0,92
				0,45	5,36	0,45
				0,7	8,33	0,25

ρ_s : densidade aparente do solo; V_p : Volume de poros; θ_s : umidade volumétrica; Q: Vazão; q: densidade de fluxo de Darcy; T₀: tempo de aplicação do pulso

As curvas médias de eluição do KBr ajustadas pelo modelo CDE, em colunas com os solos Recife e Macon, saturadas nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ e com a concentração de 1 g L⁻¹ de KBr são apresentadas na Figura 24.

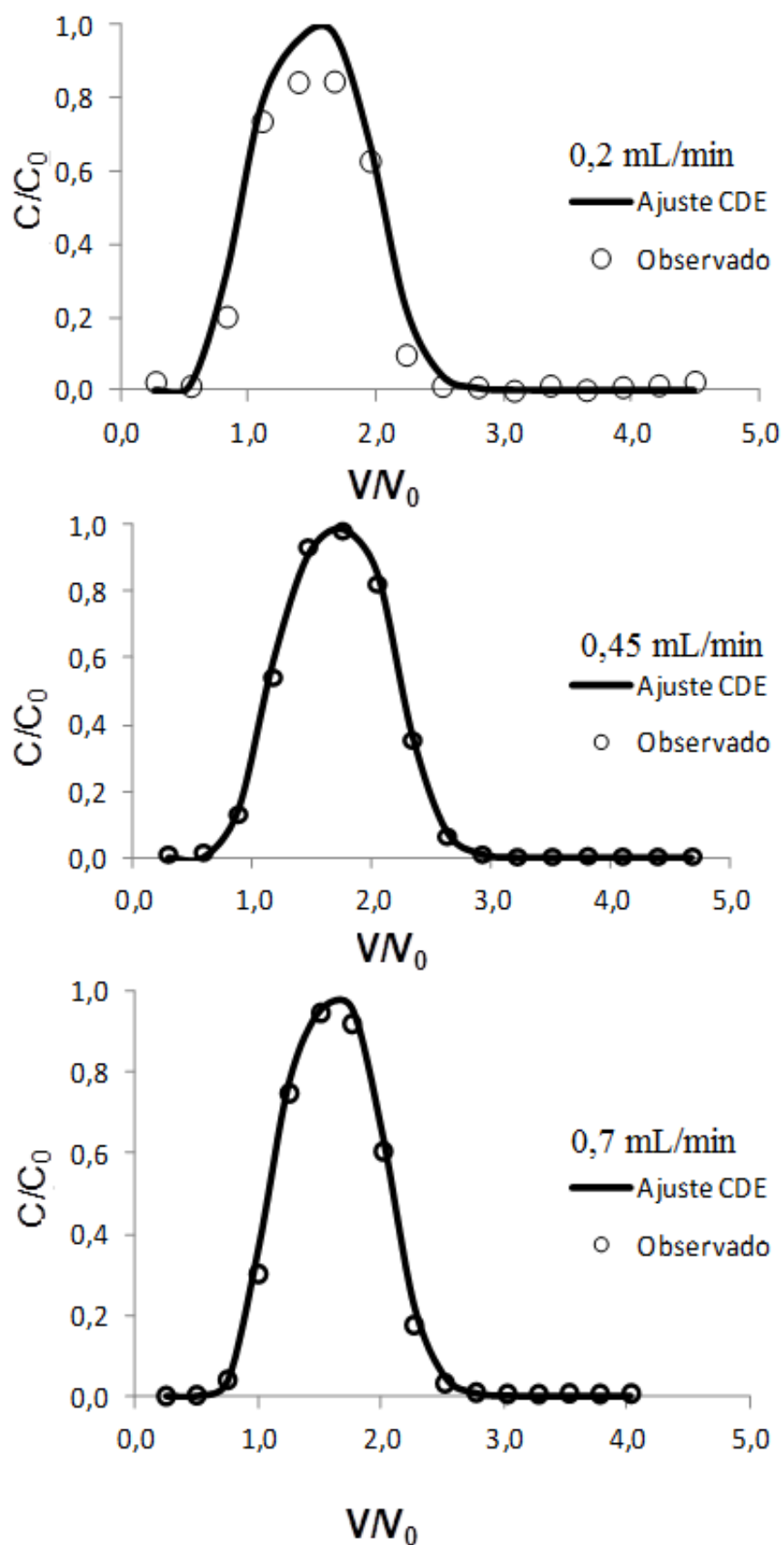


Figura 24- Curvas médias de eluição do KBr ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ e na concentração de 1,0 g L⁻¹

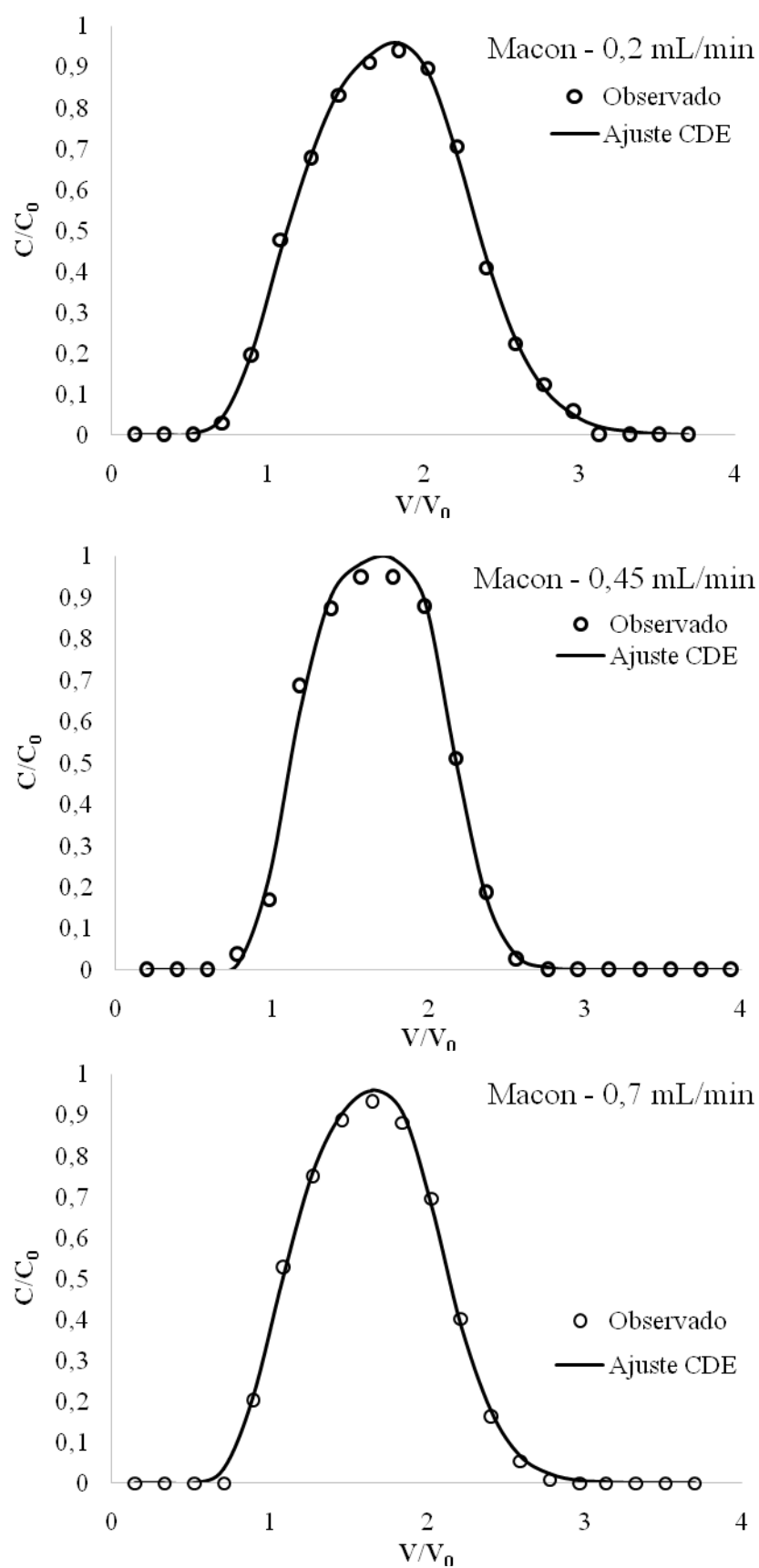


Figura 25 - Curvas médias de eluição do KBr ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ e na concentração de 1,0 g.L⁻¹

O ajuste do modelo CDE aos pontos da curva de eluição do KBr para os dois solos, nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ foi adequado (Figura 24 e Figura 25). Em todos os ensaios além de ter ocorrido uma simetria no trecho ascendente e descendente de cada uma das curvas, também as curvas de eluição e as curvas ajustadas pelo modelo CDE passaram pelo ponto (0,5 C/C₀; 1,0 V/V₀) (Figura 24 e Figura 25), confirmando a boa qualidade do KBr como traçador químico, estando esses resultados de acordo com a literatura (Costa et al., 2006; Milfont et al., 2008; Carmo et al., 2012).

Os valores médios das condições experimentais e dos parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com o KBr na concentração de 1 g L⁻¹, para o solo Recife e Macon, nas três vazões estudadas apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições experimentais e parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com KBr nos solos Recife e Macon

Q (ml min ⁻¹)	v (cm h ⁻¹)	D (cm ² h ⁻¹)	R	r ²	Λ (cm)	Pe
Recife						
0,2	6,28 ± 0,04	1,61 ± 0,07	0,83	0,99	0,25	19,50
0,45	10,52 ± 0,05	2,59 ± 0,06	0,65	0,99	0,24	20,30
0,7	16,43 ± 0,03	4,07 ± 0,03	0,71	0,98	0,24	20,18
Macon						
0,2	4,00 ± 0,04	0,66 ± 0,02	1,16	0,99	0,16	30,30
0,45	7,72 ± 0,03	0,51 ± 0,05	1,02	0,99	0,06	75,68
0,7	12,94 ± 0,06	1,65 ± 0,08	1,10	0,99	0,12	39,21

($\chi \pm \sigma$): média ± desvio padrão; Q: vazão; v: velocidade média da água nos poros; D: coeficiente de dispersão hidrodinâmico; R: fator de retardamento; λ: Dispersividade; Pe: n° de Péclet.

Os valores médios do fator de retardamento, R, no solo Recife, nas três vazões utilizadas e na concentração de 1 g L⁻¹, ficaram próximos à unidade, indicando que o KBr não sofreu interações nesses solos (adsorção ou exclusão) (Tabela 12). No solo Recife, nas três vazões, foi constatada uma leve exclusão aniônica, especialmente na vazão de 0,45 cm min⁻¹.

A dispersividade, λ, foi obtida considerando-se a relação linear entre o coeficiente de dispersão hidrodinâmico, D, e a velocidade média da água nos poros, v,

ou seja, $D = \lambda v$. A partir dos valores de D ajustados e de v determinou-se λ para os dois solos (Tabela 12), uma vez que a dispersividade está diretamente relacionada com o diâmetro médio das partículas de solo (Milfont et al., 2006).

O solo Recife foi o mais dispersivo dos dois solos possivelmente em função de diferenças no tamanho e arranjo de suas partículas, os quais tendem a induzir a formação de poros largos, favoráveis a uma importante distribuição de velocidades da água.

Em relação ao número de Péclet, verifica-se que nos dois solos e nas três vazões estudadas, os valores de Pe foram maiores que 10 (Tabela 12), indicando que o processo predominante de transporte é do tipo convectivo (Novy Quadri, 1993).

5.5.3 Transporte reativo do SMX

Os ajustes realizados pelo modelo CDE (utilizando os valores de D obtidos nos ensaios com KBr) aos pontos das curvas médias de eluição do SMX nas colunas do solo Recife, nas vazões três vazões estudadas e nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M são apresentados nas Figuras 26, 27 e 28.

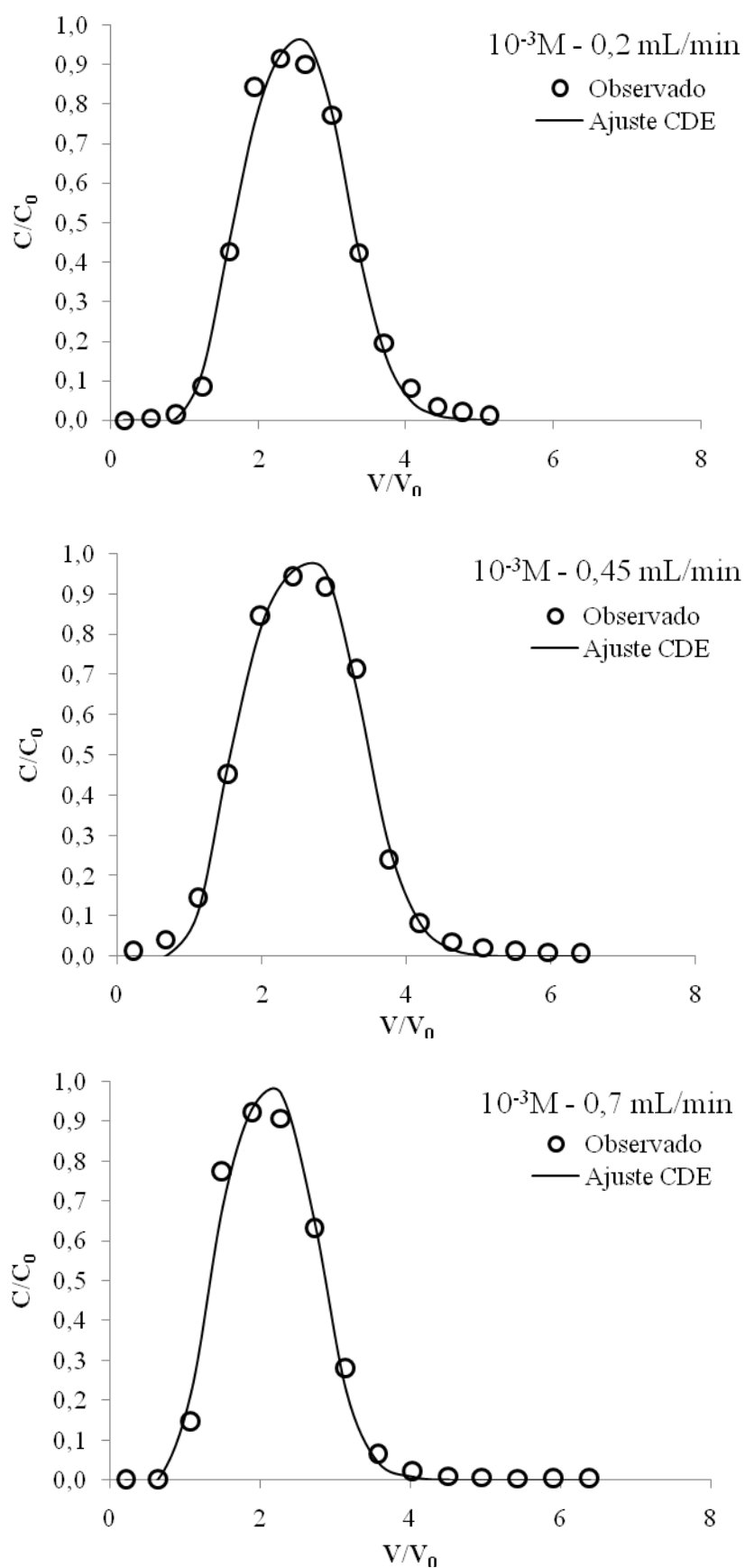


Figura 26 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10⁻³M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL.min⁻¹.

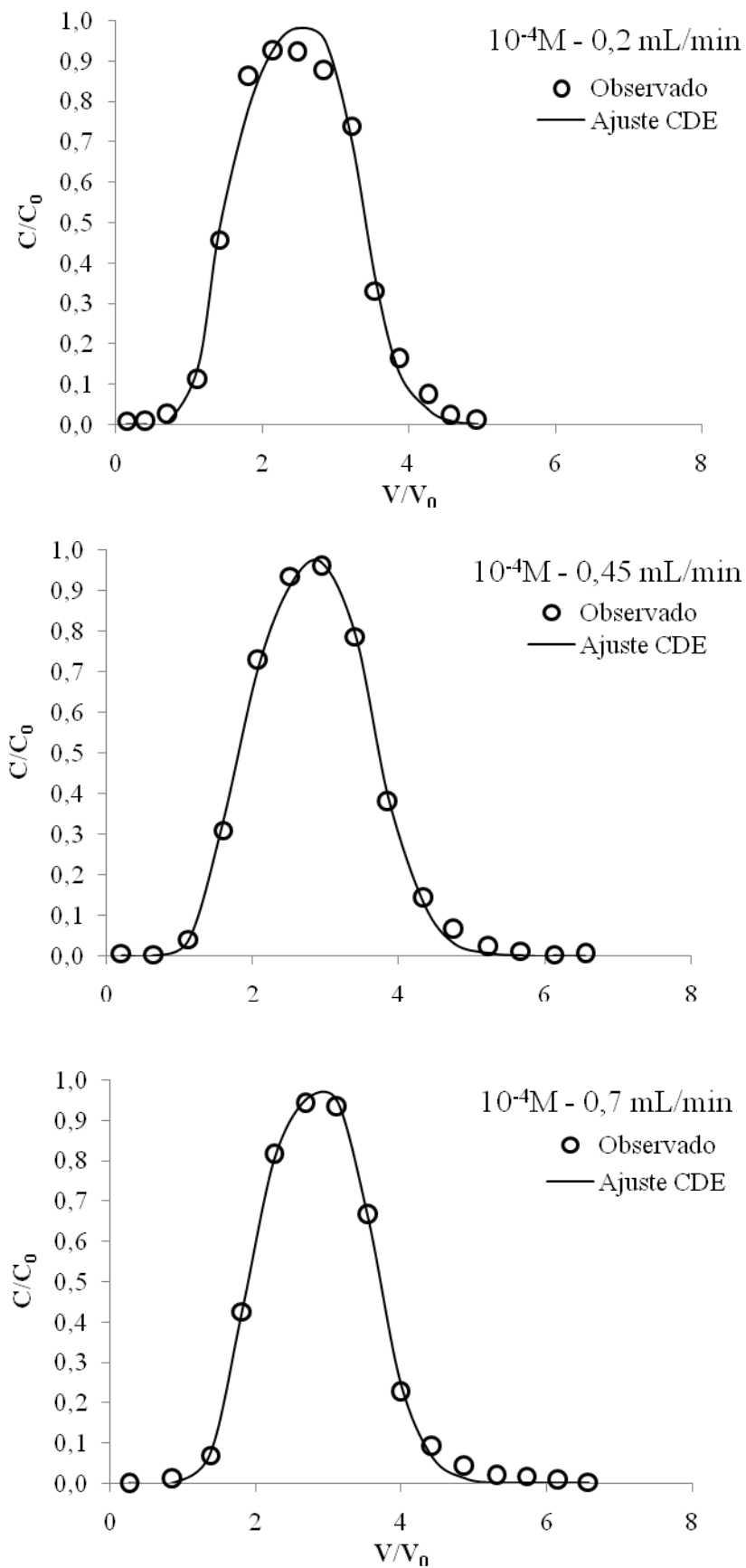


Figura 27 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10⁻³ M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min.

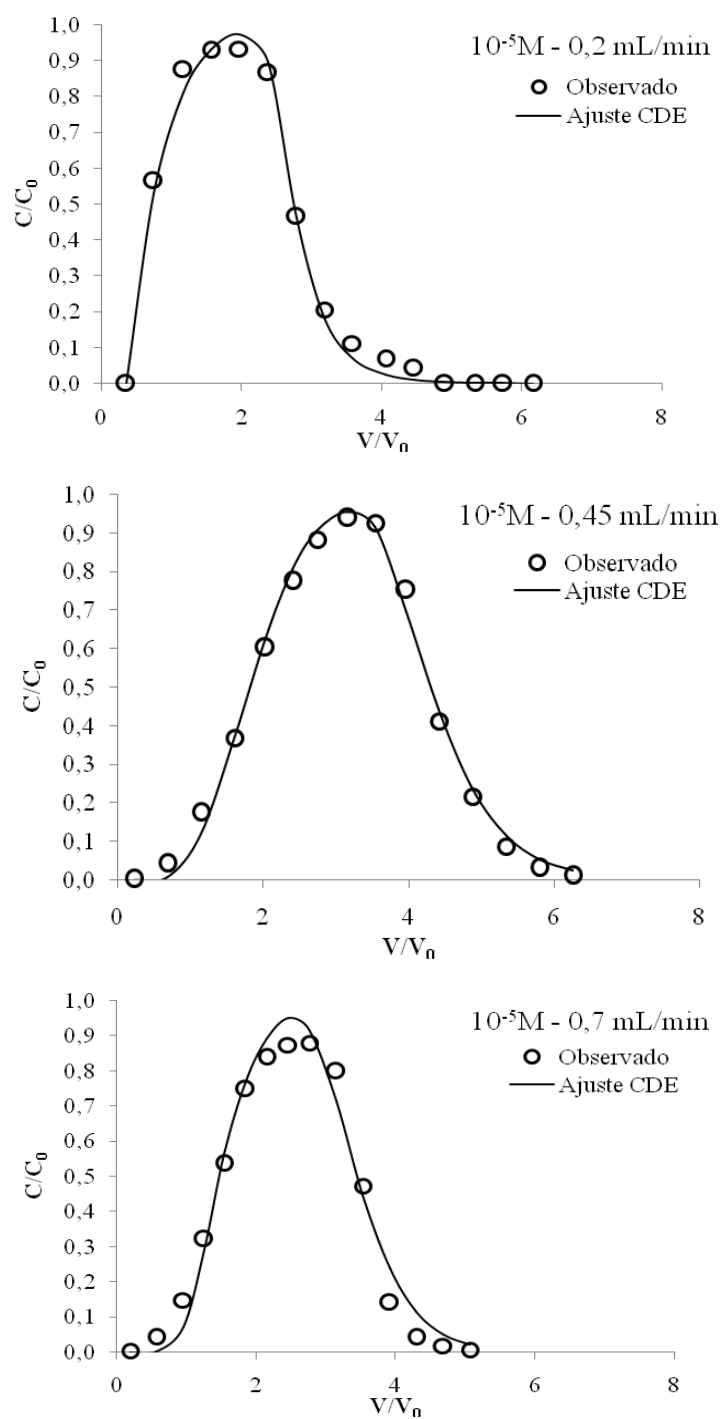


Figura 28 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Recife na concentração de 10^{-5} M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min.

Nas Figuras 29, 30 e 31 são apresentados os ajustes realizados pelo modelo CDE aos pontos das curvas médias de eluição do SMX nas colunas do solo Macon, nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ e nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M.

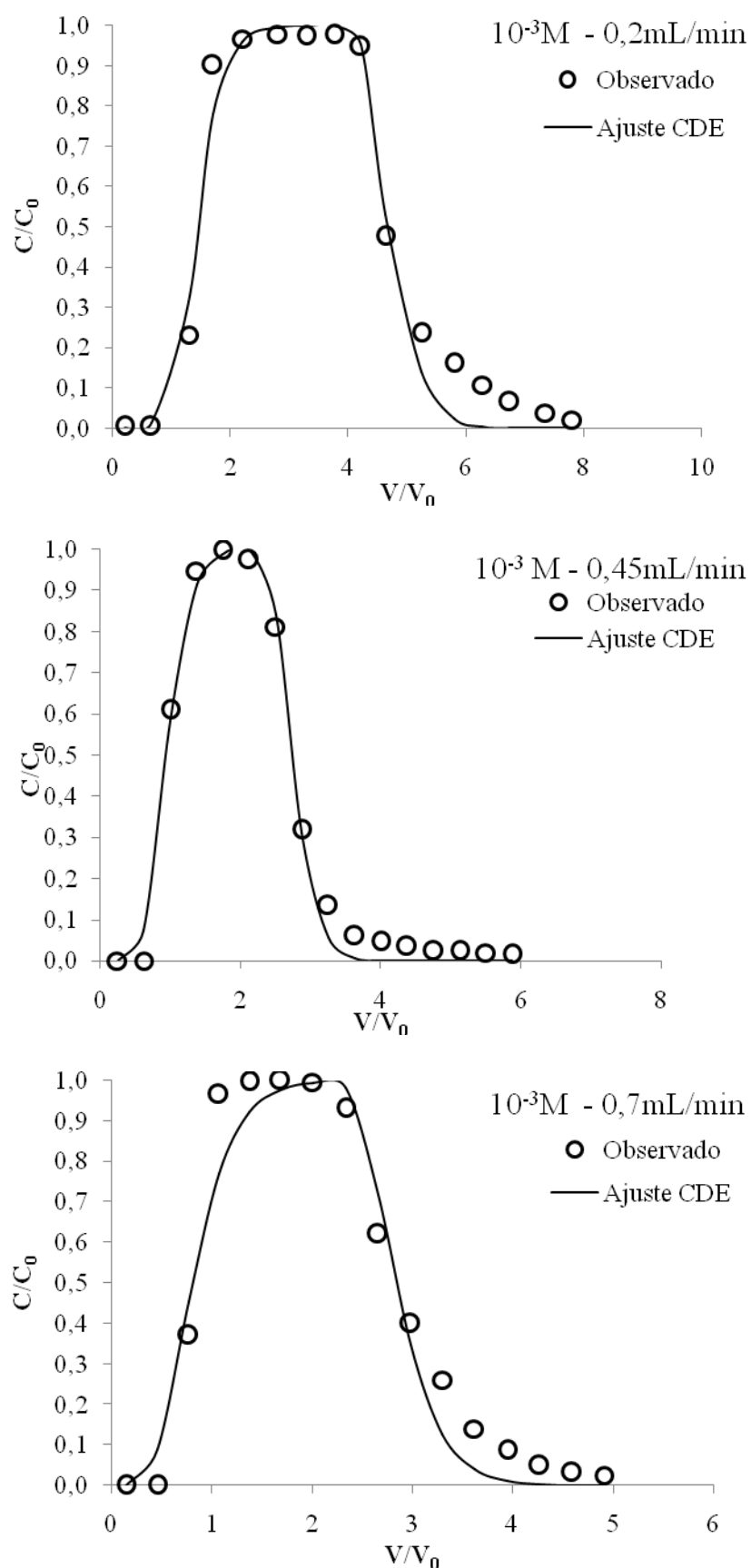


Figura 29 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-3} M nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 mL/min.

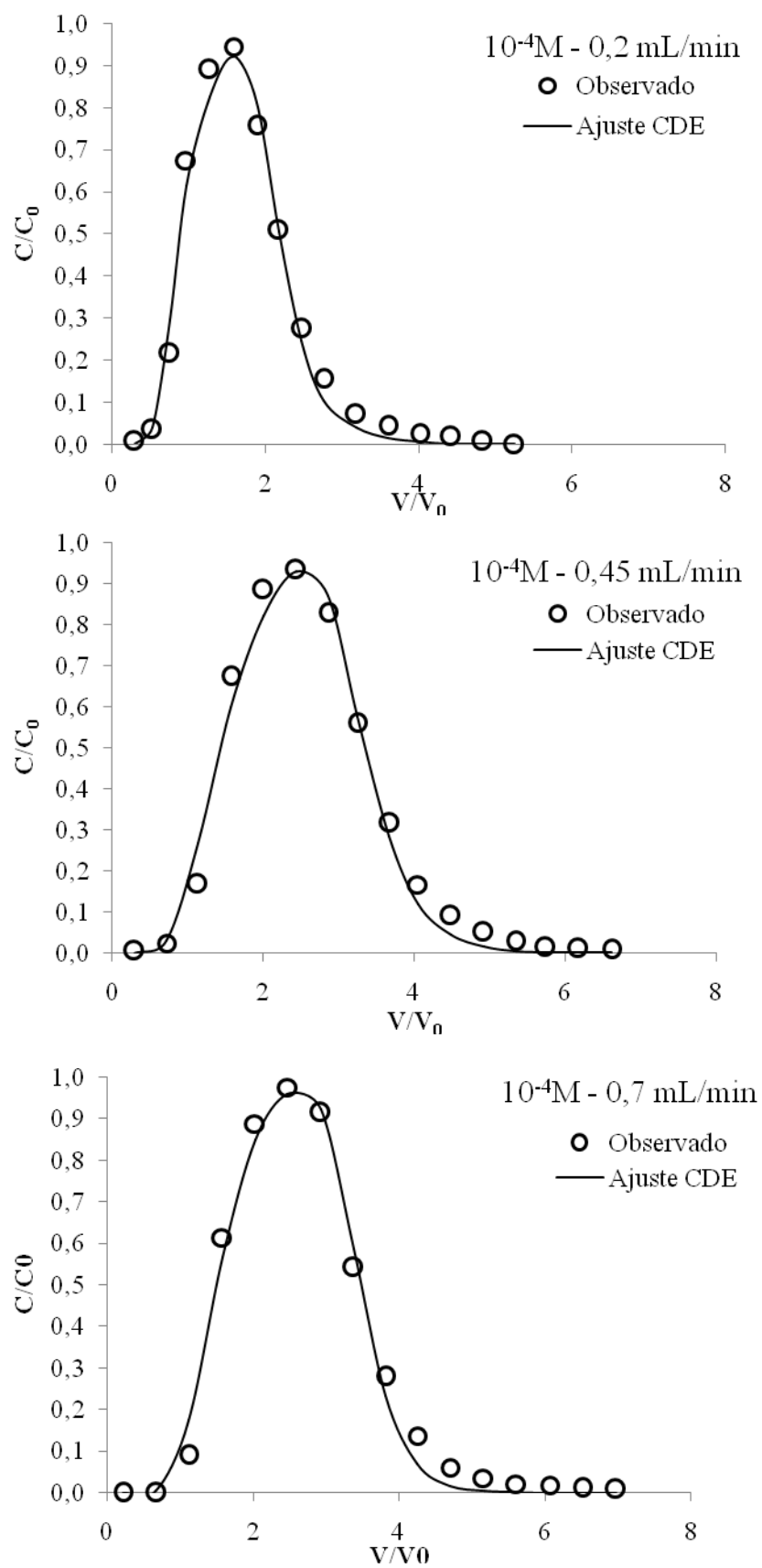


Figura 30 - Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-4}M nas vazões de 0,2, 0,45 e 0,7 mL/min.

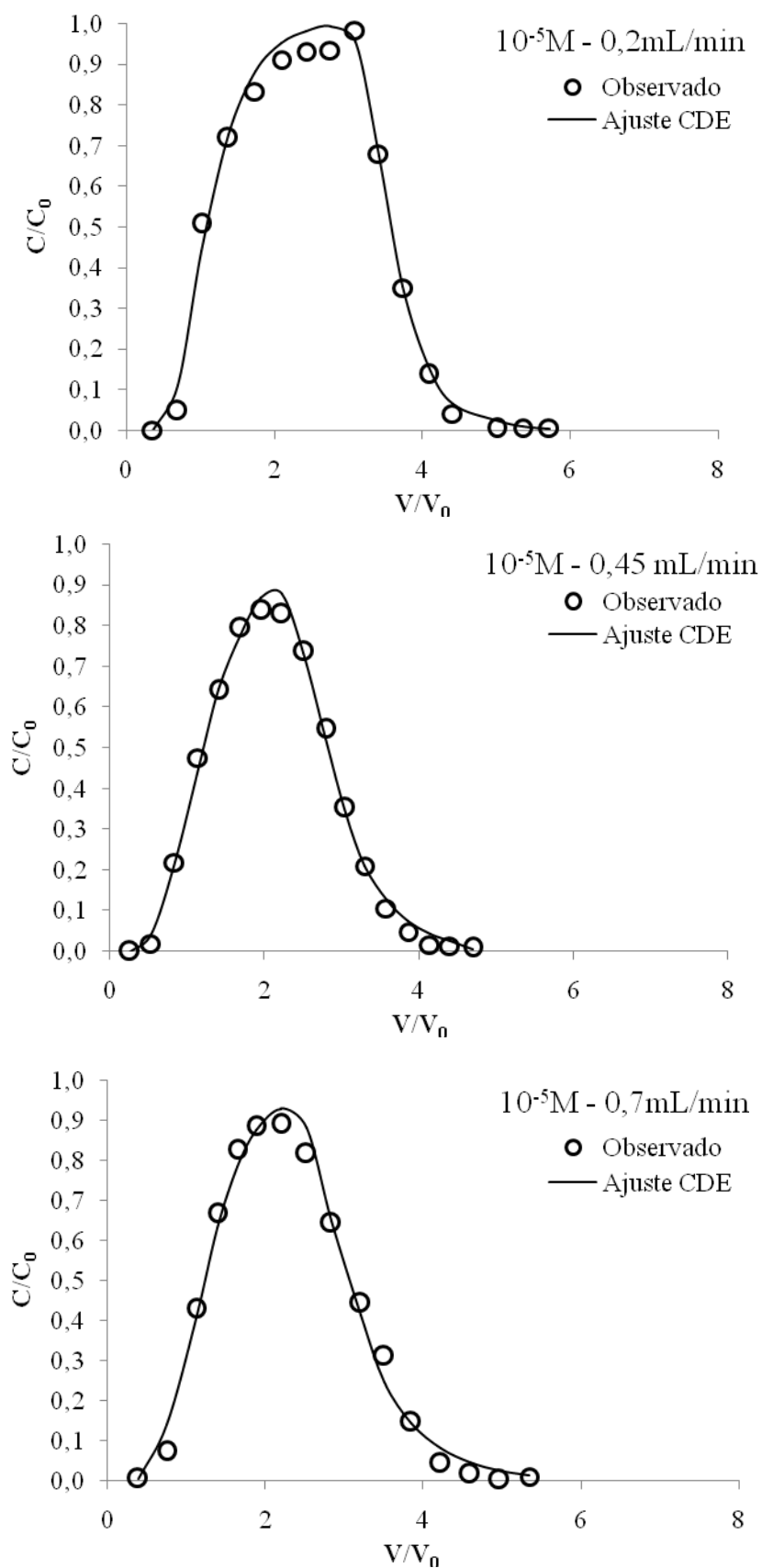


Figura 31- Curvas médias de eluição do SMX ajustadas pelo modelo CDE, em colunas de solo Macon na concentração de 10^{-5} M nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 mL/min.

O solo Recife apresentou o maior tempo de retenção para o SMX, enquanto que o solo Macon apresentou um menor. Por meio das Figuras 26 a 31, verifica-se que o modelo CDE ajustou-se bem aos pontos das curvas médias de eluição do SMX dos dois solos. Os valores médios das condições experimentais e dos parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com SMX nas concentrações 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M, para o solo Recife e Macon, nas vazões de 0,2; 0,45 e 0,7 ml min⁻¹ são apresentados na Tabela 13

Tabela 13 – Valores médios das condições experimentais e dos parâmetros hidrodispersivos dos ensaios de deslocamento miscível com SMX nos solo Recife e Macon, nas vazões de três vazões estudadas e nas concentrações 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M, respectivamente.

	Q (ml min ⁻¹)	V (cm h ⁻¹)	D (cm ² h ⁻¹)	R	r ²
Recife					
10 ⁻³ M	0,20	3,27 ± 0,06	0,31 ± 0,01	0,87	0,98
	0,45	9,84 ± 0,05	1,37 ± 0,02	0,92	0,99
	0,70	9,88 ± 0,04	1,37 ± 0,02	0,91	0,98
10 ⁻⁴ M	0,20	2,86 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,79	0,99
	0,45	10,11 ± 0,02	1,25 ± 0,01	1,02	0,99
	0,70	18,85 ± 0,04	1,41 ± 0,02	1,11	0,99
10 ⁻⁵ M	0,20	4,13 ± 0,05	2,82 ± 0,03	0,44	0,98
	0,45	10,03 ± 0,02	2,70 ± 0,04	1,09	0,99
	0,70	8,53 ± 0,04	1,85 ± 0,01	0,90	0,96
Macon					
10 ⁻³ M	0,20	5,22 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,69	0,97
	0,45	6,25 ± 0,06	1,89 ± 0,02	0,73	0,99
	0,70	12,73 ± 0,05	1,28 ± 0,01	0,52	0,96
10 ⁻⁴ M	0,20	4,39 ± 0,04	1,40 ± 0,02	0,67	0,98
	0,45	10,61 ± 0,03	2,44 ± 0,01	0,65	0,98
	0,70	18,17 ± 0,03	2,70 ± 0,01	0,89	0,98
10 ⁻⁵ M	0,20	6,43 ± 0,04	3,38 ± 0,02	0,75	0,97
	0,45	11,90 ± 0,02	7,18 ± 0,03	1,14	0,98
	0,70	13,08 ± 0,01	7,48 ± 0,01	0,67	0,98

($\chi \pm \sigma$): média ± desvio padrão; Q: Vazão; v: Velocidade média da água nos poros; D: Coeficiente de dispersão hidrodinâmico; R: Fator de retardamento

O solo Recife apresentou retardamento (Tabela 13), sendo o solo mais reativo dentre os solos estudados. Esse comportamento pode ser explicado possivelmente pelas interações do SMX com os óxidos de ferro (goetita) presentes nesse solo.

Esse resultado é corroborado pelos trabalhos de Gao & Pedersen (2010) os quais, verificaram que em condições aquosas, a goetita (pH_{PCZ} de 7-9) no $pH < 7-9$ apresenta uma carga positiva de superfície e em $pH > 7-9$, uma carga negativa. Sob condições neutras de pH 6-7, as forças eletrostáticas favoreceram a adsorção do ânion de SMX na superfície carregada positivamente desse mineral. A associação eletrostática entre o ferro e os grupos funcionais elétron suficientes do SMX, como as carbonilas, pode ser considerado como um dos principais mecanismos de adsorção.

Por sua vez, a elevada mobilidade (baixo fator de retardamento) do SMX encontrada no solo Macon é consistente com vários estudos (Thiele, 2003; Boxall et al, 2003, Thiele-Bruhn et al., 2004 & Burkhardt et al., 2005).

Apesar de o solo Macon apresentar um maior conteúdo de matéria orgânica, foi observada uma baixa adsorção do SMX nesse solo, possivelmente pela baixa quantidade de componentes polares presentes na matéria orgânica que foram incapazes de interagir com os sítios de ligação do SMX, conforme demonstrado por Thiele (2000).

Dessa forma, o solo Recife, em relação ao Macon, apresentou o menor risco de contaminação do lençol freático existente nessa região, frente a uma possível contaminação pelo SMX, enquanto que o solo Macon apresentou o maior risco.

Srinivasan et al, 2014 observaram que a quantidade máxima recuperada para o traçador brometo foi calculada como sendo 93% e 94% para dois solos na Índia. Kurwadkar et al. (2011), observaram que o avanço de Br⁻ ocorreu entre 1 e 2 volumes de poros em 3 solos norte-americanos com várias propriedades físicas e químicas. Os autores também relataram recuperações de brometo de variam entre 95 e 100%.

O avanço para os antibióticos ocorreram entre 1,06 e 1,60 volumes de poros para Matawhero, e entre 2,36 e 2,65 volumes de poros para o solo Hamilton com 51% de silte, 19% de areia e 30% de argila. A porcentagem máxima recuperada na lixiviação para o sulfametoxazol, sulfacloropyridazina e sulfametazina para solos Matawhero (62% de silte, 11% de areia e 27% de argila) foram 65,4%, 78,1% e 45,4%, respectivamente. Para Hamilton, no entanto, recuperações máximas para os três antibióticos foram muito mais baixos, variando de 17 para 58%. Estes autores observaram que as sulfonamidas podem comportar-se de uma maneira semelhante a um

traçador conservador e o seu transporte são dependentes do tipo de solo. Recentemente, Kurwadkar et al. (2011) relataram que as recuperações no efluente da coluna de sulfametazina e sulfatiazol foram de 50 a 90% e 34 a 75%, respectivamente. Em outro estudo 69-99,7% de sulfametoxazol, juntamente com seu metabólito primário, foi recuperado em efluentes de coluna (Fan et al., 2011).

6. CONCLUSÕES

Esta tese em cotutela foi realizada no LTHE da Universidade de Grenoble e no DEN da Universidade Federal de Pernambuco. Esta pesquisa multidisciplinar teve como objetivo caracterizar os principais processos que controlam o destino e o impacto de um antibiótico, sulfametoxazol, em solos em ambiente tropical e temperado. Dois solos com textura muito semelhante (siltosos) foram coletados um em Recife, e outro no Brasil e Macon, na França, para representar ambientes tropicais e temperadas, respectivamente.

O trabalho consistiu, primeiramente, em caracterizar o potencial de sorção (isotérma e cinética) do SMX em cada um dos solos para estimar a sua retenção no solo e identificar as fases principais responsáveis para a sorção e os mecanismos correspondentes. Como esperado, o SMX é pouco retido em ambos os solos (Smáx de 100 a 120 ng SMX g⁻¹ de solo o pH dos dois solos), com isothermas de sorção não-instantânea (cinética de segunda ordem de sorção) e não linear em ambos os solos é bem representado pelo modelo de Freundlich e o de Langmuir, prenunciando biodisponibilidade significativa e mobilidade desse antibiótico em ambos os tipos de solo.

O impacto do SMX foi avaliado através da combinação de uma abordagem quantitativa (enumeração de bactérias heterotróficas totais cultiváveis resistentes ao SMX) e uma abordagem qualitativa (mudança no índice de diversidade bacteriana (Shannon e Simpson) medido por rastros moleculares do tipo DGGE). Após a contaminação dos solos com SMX em concentrações que variam de 10⁻⁵ a 10⁻³M, uma rápida diminuição do número total de bactérias do solo foi observada (- 32 e - 55% nos solos de Macon e Recife, respectivamente) em combinação com um rápido aumento no número e na percentagem de bactérias resistentes (+ 34 e + 20%, em solos de Macon e Recife, respectivamente), que, em seguida, foi representado por até 35% do total de bactérias (solo Macon) indicando um impacto significativo sobre as comunidades bacterianas do solo. Sobre o efeito do SMX na diversidade microbiana, os resultados sobre os solos não contaminados mostraram estruturas iniciais das comunidades microbianas muito diferentes entre os dois solos, embora os índices de biodiversidade (Shannon) foram semelhantes e elevados em ambos os solos e assim como em riqueza taxonômica. Observou-se um efeito significativo do SMX em ambos os solos, porém

mais importante no solo do Recife. Por último, a estrutura da comunidade microbiana mudou significativamente ao longo do tempo (redução da biodiversidade e riqueza bacteriana) independente da concentração de antibiótico utilizado, ao contrário do solo Macon, que foi menos afetada e parece, portanto, mais estável, provavelmente relacionado as bactérias mais resistentes adaptadas ao SMX. Após a contaminação com o SMX, observou-se o rápido desaparecimento de certas populações sensíveis e o surgimento de populações resistentes ao antibiótico em perfis DGGE. As populações bacterianas cultiváveis totais e resistentes ao SMX foram identificadas por sequenciamento do DNAr16S, que mostraram uma forte predominância de bactérias do gênero *Burkholderia* já conhecido por degradar muitos poluentes orgânicos, como pesticidas ou HAPs. Bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Arthrobacter* também foram identificadas entre as bactérias dominantes após contaminação com SMX. Uma espécie de bactéria comum aos dois solos e resistente ao SMX pode ser identificada como uma bactéria do gênero *Arthrobacter*. Também foi identificada uma bactéria cultivável cuja população domina (40%) a estrutura da comunidade bacteriana (DGGE) no solo Recife. Esta bactéria está relacionada com o gênero *Burkholderia* e tem capacidade de resistência ($CIM > 1 \text{ g.L}^{-1}$) e degradação de SMX ($T_{1/2} \approx 0,5 \text{ d}$) sugerindo um potencial muito importante para biorremediação de ambientes (aquáticos ou terrestres) contaminados por este tipo de produto.

Além disso, os genes de resistência ao SMX, *sul1* e *sul2* foram detectados no DNA extraído das bactérias nos solos Macon e Recife antes e após a adição de SMX indicando a existência de um importante reservatório de bactérias resistentes a este antibiótico.

Os resultados sobre a degradação do SMX em ambos os solos mostraram que o antibiótico tem uma persistência relativamente baixa, com uma meia-vida variando de acordo com a concentração inicial de entre 6 e 52 dias para o solo Macon e entre 25 e 80 dias para o solo Recife. A degradação do SMX parece ser mais inibida a 10^{-4} M de SMX, confirmando a uma menor adaptação deste solo para a presença deste antibiótico. A degradação do SMX é aproximadamente metade de degradação química (hidrólise...), correspondendo ao resto da biodegradação efetuada por microrganismos específicos, e, em particular, pela *Burkholderia* previamente identificados e caracterizados. Os parâmetros de sorção e degradação caracterizados nas duas primeiras partes do trabalho foram utilizados para calcular um índice de risco de contaminação de aquíferos em ambos os solos, ou 2,87 - 5,6 para solo Macon e 5 - 6,85 para o solo Recife. Em ambos

os solos, o índice calculado é superior a 2,8, o que indica um alto risco de contaminação da água, particularmente no solo do Recife, em conexão com a persistência mais forte de SMX neste solo.

Para validar esses índices de risco, a mobilidade do SMX foi avaliada pelos testes de coluna que mostraram uma mobilidade diferente do SMX nos dois solos e superior no solo Macon (bem representado por uma modelagem do tipo convecção-dispersão), contrariando os resultados de sorção que sugeriam uma retenção mais forte do antibiótico neste solo. No entanto, esta mobilidade parece ser muito alta nos solos, de acordo com a literatura, indicando um forte potencial de transferência em ambos os solos e, portanto, um risco significativo de contaminação das águas subterrâneas.

Todos estes resultados mostram que o SMX é uma molécula pouco reativa com os componentes do solo e, portanto, tem uma alta mobilidade, dificultado pela presença de matéria orgânica no solo Macon e óxidos de ferro no solo Recife. Este antibiótico é degradado rápido e significativamente por mecanismos bióticos e abióticos, dando-lhe uma persistência baixa, mas contrastando em ambos os solos estudados, especialmente para baixas concentrações que podem ser encontrados no meio ambiente. Apesar desta baixa persistência, e como a maioria das moléculas bioativas, este antibiótico parece altamente biodisponível em ambos os solos e tem um impacto significativo sobre os microrganismos, mesmo em baixas concentrações, modificando a estrutura de suas comunidades bacterianas, e favorecendo a emergência constante de populações adaptadas à presença desse antibiótico e a sua rápida biodegradação.

Todos estes resultados, portanto, abre novas questões, incluindo o risco associado com o aumento da propagação de antibióticos no ambiente mostrando claramente dois tipos distintos de riscos: contaminação das águas subterrâneas por compostos orgânicos potencialmente tóxicos e o desenvolvimento de resistência bacteriana em solos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARIZON, R. R. M.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; PRATA, F.; TORNISIELO, V. L. Simulação do Transporte e da Sorção de Imazaquin em Colunas de Solo, *Revista Brasileira Ciência do Solo* v. 30 n. 4 Viçosa jul/ago, 2006.

BERNARD, H.; CHABALIER, P. F.; CHOPART, J. L.; LEGUBE, B.; VAUCLI, M. Assessment of herbicide leaching risk in two tropical soils of reunion island (France). *Journal of Environmental Quality* v. 34, p. 534-543, 2005.

BOUKI, C.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E., Detection And Fate of Antibiotic resistant bacteria. In wastewater treatment plants: A Review, *Ecotoxicol. Environmental Saf.*, 91, p. 1–9, 2013

BRUSSEAU, M. L. The influence of solute size, pore water velocity, and intraparticle porosity on solute dispersion and transport in soil, *Water Resources Research*, v. 29, p. 1071 – 1080, 1993

BURKHARDT, M.; STAMM, C.; WAUL, C.; SINGER, H. & MÜLLER, S. Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality*, v. 34,p. 1363-1371, 2005.

CAMERON, D.A.; KLUTE, A. Convective-dispersive solute transport with a combined equilibrium and kinetic adsorption model. *Water Resources Research.*, 19:718-724, 1977.

CARMO, A. I.; ANTONINO, A. C. D.; NETTO, A. M. & CORREA, M. M. Caracterização hidrodispersiva de dois solos da região irrigada do vale do São Francisco. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola. Ambiental*, v. 14, p. 698-704, 2012.

CHEN, H.; GAO, B.; LI, H. Functionalization, pH, and ionic strength influenced sorption of sulfamethoxazole on grapheme, *Journal of Environmental Chemical Engineering* v. 2, p. 310–315, 2014

CHIRNSIDE, A. E. M.; RITTER, W. F.; RADOSEVICH, M.; Biodegradation of aged residues of atrazine and alachlor in a mix-load site soil, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 2484–2492, 2009

COMENGA, V.; COPPOLA, A.; SOMMELLA, A. Effectiveness of equilibrium and physical non-equilibrium approaches for interpreting solute transport through undisturbed soil columns, *Journal of Contaminant Hydrology*, n. 50, p. 121-138, 2001

COSTA, C. T. F.; ANTONINO, A. C. D. & NETTO, A. M. Ensaios de deslocamento de líquido miscível na determinação dos parâmetros hidrodispersivos de um solo aluvial. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 11, p. 111-122, 2006.

DAVIDSON, J. M.; REICK, C. E.; SANTELMAN, P. W. Influence of water flux and porous materials on the movement of selected herbicides, Soil Science Society of America, v. 32, p. 629-633, 1968.

DYKAAR, B. B.; KITANIDIS, P. K.; Transmissivity of a heterogeneous formation. Water resources research, 32, p. 307-320, 1996.

FENET, H.; MATHIEU, O.; MAHJOUR, O.; LI, Z.; HILLAIRES-BUYS, D.; CASELLAS, C., Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in tunisia, Chemosphere, v. 88, p. 49–54, 2012

FLETCHER CL, KAUFMAN DD. Effect of sterilization methods on 3-chloroaniline behavior in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 28, p. 667–71, 1980

GANG, D. C.; CLEVINGER, T. E.; BANERJI, S. K.; Modeling Chlorine Decay in Surface Water, Journal of Environmental Informatics v. 1, p. 21- 27, 2003

GAO, J., PEDERSEN, J.A., Sorption of sulfonamide antimicrobial agents to humic, Journal of Environmental Quality, v. 30; p. 228-35, 2010

GUO, X.L.; ZHU, Z. W.; LI, H. L, Biodegradation of sulfamethoxazole by *Phanerochaete chrysosporium*, Journal of molecular liquids v. 198, p. 169–172, 2014

HERNÁNDEZ, V.M.; MEFFE, R.; HERRERA, S.; ARRANZ, E.; BUSTAMANTE, I. Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment, Science of the total environment, v. 15, p. 273–281, 2014

HIRSCH, R.; TERNES, K.; HEBERER, K. & KRATZ, L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total Environ., 225:109–118, 1999

JAYNES, D. B.; LOGSDON, S. D.; HORTON, R. Field method for measuring mobile/immobile water content and solute transfer rate coefficient, Soil science society of America Journal, v. 59, p. 352-356, 1995.

KINNEY, C. A.; FURLONG, E. T.; ZAUGG, S. D.; BURKHARDT, M. R.; WERNER, S. L.; CAHILL, J. D.; JORGENSEN, G. R. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. Environmental Science & Technology, v. 40, p. 7207–7215, 2006.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, v. 36, p. 1202–1211, 2002

LINDSEY, M.E.; MEYER, M. & THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 4640–4646, 2001.

LIU, S.; SAUL, N.; BO PAN, B.; MENZEL, R.; STEINBERG, C. E. W. The non-target organism *Caenorhabditis elegans* withstands the impact of sulfamethoxazole, *Chemosphere*, v. 93, p. 2373–2380, 2013

LÓPEZ-GALINDO, C.; GARRIDO, M. C.; CASANUEVA, J. F.; NEBOT, E.; Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds: Sodium hypochlorite and an alkylamine surfactant, *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1779-1785, 2010

MA QL, GAN J, PAPIERNIK K, BECKER JO, YATES S.R. Degradation of soil fumigants as affected by initial concentration and temperature. *Journal of environmental quality*, v. 30, p. 1278–86, 2001

MARTINS, J. M. F.; MERMOUD, A.; Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems, *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 33, p. 187-210, 1999

MILFONT, M. L. B.; ANTONINO, A. C. D.; MARTINS, J. M. F.; NETTO, A. M. & CORREA, M. M. Caracterização hidrodispersiva de dois solos do vale do rio São Francisco, *Revista brasileira de ciências agrárias*, v. 1, p.81-87, 2006

MILFONT, M. L. B.; ANTONINO, A. C. D.; MARTINS, J. M. F.; NETTO, A. M.; GOUVEIA, E. R.; CORREA, M. M. Transporte do paclobutrazol em colunas de solos. *Revista brasileira de ciência do solo* v. 32, p. 2165-2175, 2008

MITCHELL, P. J.; SIMPSON, M. J. High affinity sorption domains in soil are blocked by polar soil organic matter components *Environ. Sci. Technol.*, 47, p. 412–419, 2013

MÜLLER, E.; SCHÜSSLER, W.; HORN, H.; LEMMER, H., Aerobic biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by activated sludge applied as co-substrate and sole carbon and nitrogen source, *Chemosphere* v. 92, 2013, p. 969–978

PÉREZ, S.; EICHHORN, P. & AGA. D.S. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24:1361–1367, 2005.

PRATA, F. Comportamento do glicofosfato no solo e deslocamento miscível da

atrazina, São Paulo, 2002, 161 p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, São Paulo.

PREVEDELLO, C. L. Física do solo com problemas resolvidos, Curitiba, 1996.

PRIMOR, O. Sorption of antibiotic to clay. Master thesis, 2008; Tel Aviv University, Israel.

WWDR4 - Relatório mundial das nações unidas sobre o desenvolvimento dos recursos hídricos disponível em: http://www.unesco.org/new/fileadmin/multimedia/field/brasil/wwdr4%20background%20briefing%20note_pt_2012.pdf, visitado em 13 de julho de 2014

Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment: review. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95, 2011

Schaffer, M.; Börnick, H.; Nödler, K.; Licha, T.; Worch, E., Role of cation exchange processes on the sorption influenced transport of cationic B-blockers in aquifer sediments, *Water Res.* 46, p. 5472–5482, 2012.a

SELIM, H.M.; DAVIDSON, J.M. & MANSELL, R.S. Evaluation of a two-site adsorption-desorption model for describing solute transport in soils. P. 444-448. *In: Proceedings of the Summer Computer Simulation Conf.*, Washington, D.C. 12-14 July 1976. Simulation Councils, La Jolla, CA. 1976.

SIMUNEK, J., M. SEJNA, M. T. VAN GENUCHTEN, The Hydrus1D software package for simulating the one-dimensional movement of water, heat, and multiple solutes in variably-saturated media, user's manual, versão 3.0, Department of environmental sciences university of California riverside, U.S. Salinity Lab., Agric. Res, California, 1999

Srinivasan, P.; et Sarmah, A. K., Dissipation of sulfamethoxazole in pasture soils as affected by soil and environmental factors, *Science of the Total Environment* p. 479–480, 2014

Srinivasan, P.; Sarmah, S. K.; Manley-Harris, M., Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature, *Science of the Total Environment* 472, p. 695–703, 2014

THIELE-BRUHN, S. & AUST, M.O. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Arch. Environ. Contaminat. Toxicol.*, 47:31-39, 2004.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.*, 166:145–167, 2003.

THIELE-BRUHN, S.; SEIBICKE, T.; SCHULTEN, H. & LEINWEBER, P. Sorption of

sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J. Environ. Qual.*, 33:1331–1342, 2004.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 3397-3406, 2001

Wu, W.H.; Chen, W.; Lin, D.H.; Yang, K. Influence of surface oxidation of multiwalled carbon nanotubes on the adsorption affinity and capacity of polar and nonpolar organic compounds in aqueous phase *Environ. Sci. Technol.*, 46, p. 5446–5454, 2012

Yu, Y.; Liu, Y.; Wu, L.S., Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils, *Environ Sci Pollut Res*, 20, p. 4261–4267, 2013.
